PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER-PASADENA, **E. BÜNNING**-TÜBINGEN, **A. ERNST**-ZÜRICH
H. v. GUTTENBERG-ROSTOCK, **R. HARDER**-GÖTTINGEN
W. SCHUMACHER-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

46. BAND, 5. HEFT

MIT 41 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 15. FEBRUAR 1956)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

Planta (Berl.)

Preis DM 19.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik.

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *H. Winkler*. Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Otto Renner*, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67.*

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 27901

46. Band. Inhaltsverzeichnis. 5. Heft

Seite

Poelt, J., und H. Doppelbaur, Über parasitische Flechten. Mit 5 Textabbildungen 467

Gutz, H., Zur Analyse der Granula-Fluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von *Mucor racemosus* Fres. Mit 5 Textabbildungen 481

Mayr, H. H., Zur Photolyse von Indol-3-Essigsäure bei papierchromatographischen Arbeiten. Mit 1 Textabbildung 512

Könemann, B., Über den Stoffwechsel von Brutknospen im Laufe der Nachreife (Untersuchungen an *Dentaria bulbifera*). Mit 10 Textabbildungen 516

Mohr, H., Die Beeinflussung der Keimung von Farnsporen durch Licht und andere Faktoren. Mit 12 Textabbildungen 534

Schwemmle, J., und R. Simon, Der Samenansatz bei Oenotheren-Kreuzungen. Mit 8 Textabbildungen 552

Planta, Bd. 46, S. 467—480 (1956).

Aus den Botanischen Staatsanstalten München.

ÜBER PARASITISCHE FLECHTEN.

Von

J. Poelt und H. Doppelbaur.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. September 1955.)

Seit langer Zeit wissen wir durch Untersuchungen vieler Forscher ziemlich gut über die sogenannten Flechtenparasiten Bescheid, d. h. nichtlichenisierte Pilze, die auf Flechten parasitieren, dies im weitesten Sinne des Wortes aufzufassen. Ihre letzte systematische Zusammenfassung haben diese Kenntnisse bei Keissler (1) erfahren, der auch die weitere biologische und systematische Literatur angibt. Des Abbayes kann in seinem „Traité de Lichénologie" darüber hinaus nur wenige neuere Arbeiten anführen.

Das Vorkommen parasitischer Flechten — Parasitismus hier wieder in einem umfassenden Sinne gebraucht — ist dagegen mit Ausnahme von Einzelangaben in systematischen Werken und einer Aufzählung Arnolds fast unbekannt geblieben, wenn man etwa von den reichlich phantasievollen Abhandlungen von Minks absieht, der viele eindeutig selbständige Flechtenarten als Gemeinschaften parasitierender Flechten mit Lagern anderer, autotropher Species ansieht. Des Abbayes erwähnt loc. cit. (p. 99) nur wenige, für unsere Fragestellung kaum typische Fälle von stark wuchernden Lichenen, z. B. Arten von *Ochrolechia*, *Pertusaria*, *Diploschistes*, die andere, schwächerwüchsige Flechtenarten überwachsen und sie mit ihren Hyphen durchdringen, sicher nicht ohne dieses Substrat soweit möglich aufzuschließen und zu verwerten. Dabei dürfte der Grund des Absterbens der Befallenen mindestens in gleichem Maße in der Überwachsung und im Abschluß von Licht und Feuchtigkeit zu vermuten sein wie in einer parasitischen Aktivität der Angreifer.

Das sehr langsame Wachstum der Flechten und ihre schwierige Kultivierbarkeit verbieten es, in Frage kommende Fälle experimentell zu prüfen. Wir müssen uns also, um zu Aussagen zu kommen, vorwiegend biologischer und morphologisch-anatomischer Kriterien bedienen. In diesem Rahmen werden wir parallel zu anderen vergleichbaren Gruppen im Pflanzenreich als Maßstäbe des Parasitismus betrachten das ± konstante Vorkommen nur auf anderen Flechten unter ± weitgehender Spezialisierung sowie die Reduktion der assimilierenden Organe, also in erster Linie der Lager, im Zusammenhang mit dem

fortschreitenden Parasitismus. (Der bei pilzlichen Parasiten so häufige Ersatz der geschlechtlichen Vermehrung durch die viel raschere ungeschlechtliche Ausbreitung ist bei den parasitischen Flechten mit Ausnahme weniger *Lecidea*-Species nicht festzustellen.)

Unter Zugrundelegung dieser Kriterien lassen sich einige biologische Gruppen bilden, die eine gewisse Übersicht vermitteln sollen.

Vorangestellt seien einige mögliche Fälle von Schmarotzertum auf Moosen, die der weiteren Untersuchung wert sind. Auf dem sehr kleinen, langsamwüchsigen Laubmoos *Schistidium anodon (Bryol. eur.) Loeske (= Grimmia a. Bryol. eur.)* sowie auf einer ebenso kleinen Sippe des *Schistidium apocarpum*-Komplexes findet sich in den Alpen nicht selten die Flechte *Caloplaca schistidii (Anzi) Zahlbr.*, die von keinem anderen Substrat bekannt ist. Sie bildet zum Teil randliche Lagerlappen aus, besonders bei raschem Wachstum, zum Teil besteht sie lediglich aus dicht gedrängten Apothecien mit wenigen Lagerresten. Die befallenen Moose sterben ab oder können sich kümmerlich vegetierend erhalten. Das Gegenstück in den Urgesteinsalpen sind einige zwar nicht durchgreifend, aber doch sehr konstant auf den kleinen Rasen von *Andreaea*-, in zweiter Linie auch *Grimmia*-Arten vorkommende Krustenflechten mit sehr dünnem Lager, die die Unterlage ebenfalls ± schädigen, nämlich *Caloplaca nivalis (Kbr.) Th. Fr.* und *Lecanora curvescens Mudd*, mit abgeschwächter Konstanz auch die in den Alpen sehr seltene arktische *Lecanora leptacina Smrft.*, sowie *Lecidea caesioatra Schaer.* Für alle diese Arten böte sich in ihren Lebensbereichen in der alpinen Stufe der Silikatgebirge anderes Substrat in Menge, ein Übersiedeln wurde aber doch zumindest bei den erstgenannten sehr selten beobachtet.

Unter den auf anderen Flechten schmarotzenden Arten sei eine wohl ziemlich große Gruppe von Gelegenheitsparasiten gestreift, wie man sie häufig bei den zum Teil oben erwähnten starkwüchsigen Gattungen *Pertusaria, Ochrolechia* usw. findet; sie überwachsen andere Arten und bringen sie zum Absterben. Doch gehören diese Erscheinungen eher in das Kapitel Konkurrenz denn hierher. Etwas schärfer, aber in keiner Weise obligat, ist das Schmarotzertum bei bestimmten epi- wie endolithischen Arten ausgeprägt, die normalerweise gegen benachbarte ± gleichstarke Lichenen durch deutliche Thallusränder abgegrenzt sind; geraten sie an biologisch schwächere Formen, so dringen sie unter Auflösung des Randes auf breiter Front in deren Lager ein und töten sie ab. Solches wurde z. B. bei *Rhizocarpon geographicum (L.)* DC. beobachtet, das *Lecidea*-Arten befällt, oder bei der endolithischen alpinen Kalkflechte *Caloplaca nubigena (Krempelh.) DT. et S.*, die auf diese Weise in die Thalli von *Lecidea immersa (Web.) Ach.* eindringt, oder etwa auch bei *Candelariella*-Arten, die allen möglichen Unterlagen aufsitzen. Ähnliche Fälle sind oft zu beobachten. Es steht außer Zweifel, daß man

es hier mit einer räumlichen und stofflichen Ausnutzung des unterlegenen Thallus durch den „Sieger" zu tun hat, der gleichstarke Arten völlig ungeschoren läßt.

Hier anzuschließen ist eine Gruppe von Jugendparasiten. Darunter sind Arten zu verstehen, die im allgemeinen ihre Entwicklung als Schmarotzer auf fremden Lagern beginnen, um dann nach Erreichen einiger Größe und Aufbau eines eigenen Thallus völlig autotroph weiterzuleben. Das bekannteste Beispiel dafür ist der von LETTAU (S. 114) gestreifte Fall von *Diploschistes bryophilus (Ehrh.) Zahlbr.*, der weiter unten genauer geschildert werden soll. Ähnlich verhalten sich einige gelbe *Acarospora*-Arten trockenwarmer Gebiete. *Acarospora heufleriana Kbr.* setzt sich z. B. gerne in den Rosetten von *Lecanora (Placodium) valesiaca (Müll. Arg.) Zahlbr.* fest, die im Laufe der Zeit überwachsen werden, bis schließlich der anfängliche Schmarotzer als völlig autotrophe Pflanze übrigbleibt. Ähnliches gilt für die erdbewohnende *Acarospora schleicheri (Ach.) Mass.*, die ihre Entwicklung in Lagern von *Diploschistes*-Arten der *scruposus*-Gruppe beginnt, während sich *A. microcarpa (Nyl.) Wedd.* auf *Diploschistes actinostomus (Ach.) Zahlbr.* spezialisiert hat. Alle diese Arten sind aber nur als fakultative Schmarotzer zu betrachten, da sie sich gelegentlich rein autotroph zu entwickeln vermögen. Vielleicht kann hierher auch *Lecanora nephaea Smrft.* gestellt werden, die Arten von *Rhizocarpon*, *Lecanora subgen. Aspicilia* usw. besiedelt.

Unter den Vollparasiten läßt sich eine Gruppe von Arten voranstellen, die wahllos verschiedene Flechten angreifen, wie z. B. die isidiöse *Lecidea furvella* Nyl., die auf *Rhizocarpon*- und anderen *Lecidea*-Arten zu finden ist, mit diesen Unterlagen streng an saure Silikate gebunden. Ähnliches gilt für die fast lagerlose *Caloplaca epithallina Lynge*, die auf Laub- wie auf Krustenflechten gesammelt wurde. *Acarospora hospitans Magn.* befällt Arten von *Lecidea*, *Lecanora subgen. Aspicilia* und *subgen. Eulecanora*. *Lecania thallophila Magn.* lebt auf verschiedenen chlorophyceen- und cyanophyceenhaltigen Flechten. Ökonomisch verhalten sich die Arten der Gruppe recht verschieden.

Recht erheblich dürfte die Zahl der spezialisierten Schmarotzer mit gleichwohl relativ ausgedehntem Lager sein. Bekanntere und oftmals bestätigte Beispiele geben etwa die braune *Lecidea intumescens (Flk.) Nyl.* auf *Lecanora rupicola (L.)* Zahlbr., die gelbe *Bacidia flavovirescens (Dicks.) Anzi* auf *Baeomyces*, sowie die gelbe, trotz TOBLERS (S. 405) Untersuchungen immer noch nicht klare *Buellia scabrosa (Flk.) Nyl.*, die mit ihren Wirten, gleichfalls Arten der Gattung *Baeomyces*, von der Ebene bis in die Hochalpen steigt. Hierher sind ferner viele Arten von *Acarospora* zu stellen, die besonders MAGNUSSON aus dem Mittelmeergebiet (1), Innerasien (2, 3) und anderen Teilen der Erde beschrieben

hat. Mehrere unzweifelhaft gute, parasitische Arten sind überhaupt noch nicht benannt, sowohl aus dem mitteleuropäischen Bereich, wie besonders aus dem Mittelmeergebiet. Bei den aufgezählten Species handelt es sich stets um epilithische Arten. Die submediterrane *Caloplaca oasis (Mass.) Szat.* setzt sich dagegen endolithisch in die meist ± bläulichen Lager gleichfalls endolithischer Lecanora-Arten und bildet auf ihnen orangegelbe „Oasen". Nach Aufzehrung der Unterlage verschwindet sie von selbst wieder.

Es scheint verständlich, daß zunehmender Parasitismus die Flechten der Notwendigkeit enthebt, ein der Assimilation dienendes größeres Lager zu bilden; sie werden ihren Thallus ± weit reduzieren. Allerdings kann ein solcher reduzierter Organismus nur noch dann als Flechte definiert werden, wenn er überhaupt noch symbiontische Algen enthält, entweder in der Berandung der Apothecien oder in den Resten des Lagers. In dieser Gruppe sind mehrere Angehörige der Coniocarpineen zu nennen, z. B. die Gattung *Sphinctrina*, deren Arten meist auf *Pertusaria*-Species zu finden sind, *Cyphelium sessile Trevis.* und andere. Es ist in vielen Fällen schwierig zu beurteilen, ob alle diese Arten tatsächlich noch ein Lager entwickeln, doch scheint dies nach Keissler (2) vielfach der Fall zu sein. *Candelariella superdistans (Nyl.) Malme* schmarotzt auf der rindenbewohnenden *Lecanora distans (Pers.) Nyl.*; ein Lager fehlt ihr völlig, doch finden sich im Apothecienrand noch reichlich Algen. Die unten näher skizzierte *Caloplaca congrediens (Nyl.) Zahlbr.* sitzt auf oder zwischen den Schuppen von *Candelariella vitellina (Ehrh.) Müll. Arg.*, entwickelt nur selten Thallusläppchen, enthält aber ebenfalls im Rand reichlich Algen (vgl. unten). *Rinodina soredicola Degelius* (Degelius S. 404) schmarotzt mit spärlichem Lager auf den Soralen blaualgenhaltiger Laubflechten (vgl. unten!). Der Parasitismus ist bei den Arten dieser Gruppe ökonomisch am weitesten gediehen. Die Wirte werden nicht abgetötet, sondern ertragbar ausgenützt. Es läßt sich hier von parasymbiontischen Arten sprechen.

Von dieser Stufe aus scheint der Weg zu einer völligen Ausschaltung der eigenen Assimilation durch Abstoßung aller symbiontischen Algen nicht mehr weit, damit auch der Weg von den parasitischen Flechten zu den Flechtenparasiten. Vor allem bei Arten aus dem Kreise der *Lecideales*, deren Apothecien nicht vom Lager berandet sind, wo also nicht die rudimentäre Gonidienschicht im Margo thallinus einen eindeutigen Hinweis auf die Herkunft geben kann, scheint der Übergang sehr leicht vonstatten zu gehen. Viele der sog. Flechtenparasiten sind eng verwandt mit lichenisierten Pilzen der *Lecanorales* im Sinne Nannfeldts (S. 61 usw.) und gerade in Anbetracht der geschilderten Umstände wird man dem genannten Autor in der Annahme völlig beistimmen, daß sehr viele Flechtenparasiten als reduzierte Flechten und nicht als primäre Pilze zu betrachten sind.

Untersuchung einiger Einzelfälle.

Für die Untersuchung wurden teils Gefrierschnitte *(Diploschistes bryophilus (Ehrh.) Zahlbr.* und *Rinodina soredicola Degel.)*, teils Paraffinschnitte *(Caloplaca spec., Caloplaca congrediens (Nyl.) Zahlbr.* und *Rinodina soredicola Degel.)* angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden mit Jod, teils auch mit wäßriger Gentianaviolettlösung behandelt. Zur Herstellung der Mikrotomschnitte wurden die Objekte nach Fixierung in Zenkerscher Flüssigkeit und der üblichen Nachbehandlung über verdicktes Zedernholzöl zur Herabsetzung der Sprödigkeit in Kautschukparaffin gebracht. Die paraffinbefreiten Schnitte wurden im Kollodiumhäutchen 30 Minuten bei 60° C in Azokarmin G (0,1% wäßrig) gefärbt, in 5% Phosphorwolframsäure 90 Minuten gebeizt und in Anilinblau (1% wäßrig) 90 Minuten

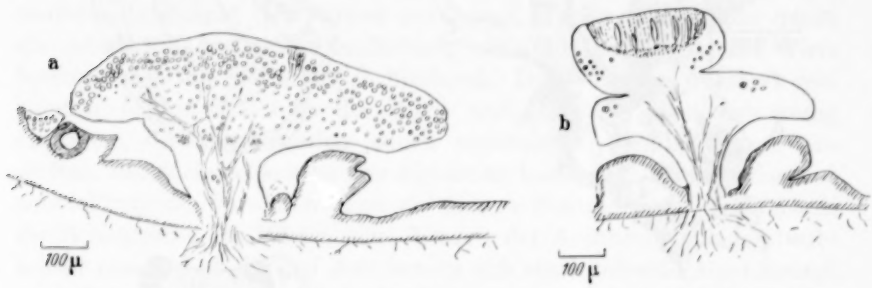


Abb. 1 a u. b. *Caloplaca sp.* auf *Verrucaria cf. nigrescens Pers.* (Brand bei Kelheim, 3. 1953, leg. H. Doppelbaur). a Schnitt durch das Lager der *Verrucaria* mit einem älteren und einem jüngeren (ganz links) Thalluslappen der *Caloplaca*. Zwischen beiden ein angeschnittener Fruchtkörper des Wirtes. b Lagerlappen des Parasiten mit aufsitzendem Apothecium.

gegengefärbt. Diese Färbung hebt die plasmareichen Teile (Algen, Hymenium, Pykniden) rot ab vom Hyphengeflecht, dessen Membranen blau erscheinen. Da verschiedene Algen und verschiedene Hyphen häufig verschieden färbbar sind, lassen sich die verschiedenen Komponenten in manchen Fällen färberisch gut auseinander halten.

Einen relativ einfachen Fall voll entwickelten, aber virulenten Schmarotzertums stellt eine noch nicht geklärte *Caloplaca*-Art (Abb. 1) dar, die von den Verf. mehrfach im Fränkischen Jura gesammelt wurde. Die Pflanze setzt sich auf dunklen *Verrucaria*-Arten fest und bildet zunächst ± rundliche, meist zerstreute Lagerläppchen, die in radialer Richtung wachsen. Ist die Keimung des Parasiten in einer Spalte des körnigen, intensiv gebräunten Wirtsthallus erfolgt, so befestigt sich das Lagerschüppchen mit zentralem Nabel im gemeinsamen Substrat. Beginnt die Entwicklung jedoch auf dem ziemlich kompakten *Verrucaria*-Thallus, so lösen sich die verankernden, nicht gebräunten Hyphenbündel immer mehr in Einzelstränge auf. Auch hier wird die oberste Schicht des Gesteins noch durchsetzt. In beiden Fällen ist das umgebende Wirtsplektenchym zumindest stark geschädigt, wenn nicht abgestorben; lebende Algen fehlen auf weite Strecken hin. Der Thallus der *Caloplaca* zeigt einen einfachen (besser vielleicht vereinfachten) Bau. Die Schichtung ist verwischt, eine ± geschlossene Rinde fehlt fast völlig. Die

beinahe ausnahmslos einzeln liegenden Algenzellen sind von der obersten Schicht bis in die Region des Nabels anzutreffen, mit einer gewissen Häufung in den oberen Thallusteilen. Pykniden findet man vereinzelt an noch ziemlich kleinen Schüppchen. Nach einiger Zeit entwickeln sich die Apothecien, die dem Thallus schließlich aufsitzen. Im unter-

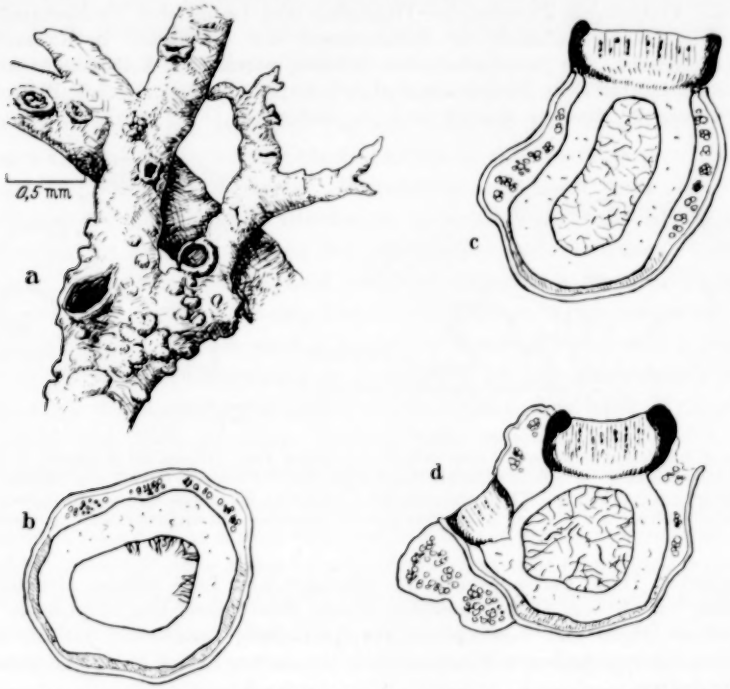


Abb. 2a—d. a Zwei sich kreuzende Podetien von *Cladonia rangiformis Hoffm.*, überzogen und verbunden von *Diploschistes bryophilus (Ehrh.) Zahlbr.* (Peloponnes, bei Chiliomodio zw. Mykene und Korinth, 4. 1954, leg. J. Poelt). In den oberen Teilen der Podetien Lagerbildung des Parasiten zwischen Zentralzylinder und Rinde des Wirtes — größere Algenansammlungen machen sich als Aufwölbungen kenntlich. Im unteren Teile des vorderen Podetiums Bildung erster Lagerpusteln außerhalb der Cladonienrinde. Verschiedentlich wird diese durch junge Apothecien durchbrochen. b, c und d Schnitte durch Podetien (selber Fundort). b Die Hyphen des Schmarotzers haben die Algenzone des Wirts abgetötet, doch den Zentralzylinder bzw. den inneren Hohlraum erst zum Teil durchzogen; oben bereits Algenkolonien des Parasiten. c Der ganze Hohlraum von Markhyphen erfüllt, oben ein reichlich sporulierender Fruchtkörper. d Zwei Apothecien sowie beginnende Lagerbildung außerhalb der Cladonienrinde.

suchten Falle waren nur noch vereinzelte Algen in kümmerndem Zustand im Thallus anzutreffen. Auch die Algen des Apothecienrandes machen keinen lebenskräftigen Eindruck. Bei älteren, auch sterilen Thalli fehlen häufig die zentralen Teile, was auf ein schnelles Wachstum und ebenso schnelles Vergehen schließen läßt.

Als Beispiel für eine in der Jugend parasitierende Flechte wurde *Diploschistes bryophilus (Ehrh.) Zahlbr.* gewählt, der vor allem *Cladonia*-Arten befällt (Abb. 2). Das erste Auftreten auf den *Cladonia*-Podetien

und -Schuppen ist habituell an einer leichten Verdickung und einer Farbänderung nach grau zu erkennen, die das Ergebnis der Abtötung der Algen durch den Parasiten ist. Dieser kann bereits auf diesem frühen, rein schmarotzenden Stadium zur Ausbildung von funktionstüchtigen Apothecien schreiten. Mit der Zeit entstehen an der Lageroberfläche des Wirts kleine Pusteln des Parasiten, die sich mehr und mehr vergrößern und zu einem eigenen Thallus zusammenschließen, der dann, nachdem der Wirt abgetötet ist und voll aufgeschlossen sein dürfte, die somit autotrophe Pflanze erhält.

Im mikroskopischen Bild ergibt sich folgendes: Im ersten Frühstadium durchzieht der Parasit mit seinen Hyphen (erkennbar durch die mindestens partielle Blaufärbung mit Jod) das Lager des Wirts bereits durch alle Gewebearten hindurch. Dabei bleiben die stark verleimten, harten Schichten der Rinde und des Zentralzylinders wenig verändert, die Algen werden jedoch anscheinend ziemlich rasch abgetötet, das lockere Gewebe der Algenzone kollabiert. Die Apothecienentwicklung des Parasiten kann auf diesem Stadium nur das Ergebnis der Ausnützung des Wirtes sein. Unweit der Apothecienanlagen beobachtet man jedoch da und dort bereits sich stark teilende Algenknäuel, zunächst unterhalb der Rinde des Wirts (von dessen Gonidien deutlich zu unterscheiden!), die offenbar die ersten Anfänge zu einem autotrophen Thallus des Schmarotzers darstellen und die durch die Risse eingedrungen sein dürften, die beim Durchbruch der Fruchtkörper durch die Rinde der *Cladonia* entstanden sind. Die Vermehrung dieser Algen führt nun zu einer teilweisen Ausfüllung der ursprünglichen Algenzone des Wirts durch die Gonidien des langsam zur Flechte werdenden Parasiten. Da aber dem weiteren Wachstum innerhalb der *Cladonia*-Podetien (im untersuchten Fall) durch die sehr widerstandsfähigen Gewebeschichten bald Grenzen gesetzt sind, beginnen die *Diploschistes*-Hyphen nun mit der Ausbildung eines Lagers außerhalb des Wirtes zunächst in der Form von Lagerkörnchen, die dann rasch heranwachsen. Verschiedenheiten der Wirtsflechten dürften die Entwicklung modifizieren, in jedem Falle steht aber am Ende ein voll autotropher Flechtenthallus des jugendlichen Schmarotzers, der es sich auf Grund dieses Vermögens erlauben kann, seinen Wirt umzubringen und voll auszunützen.

Die beiden folgenden Fälle betreffen spezialisierte, sich ökonomisch verhaltende Parasiten.

Caloplaca congrediens (Nyl.) Zahlbr. (vgl. Abb. 3; zur Synonymie vgl. Poelt, S. 236) wurde bisher nur als Bewohner der hellgelben Krustenflechte *Candelariella vitellina (Ehrh.) Müll. Arg.* bekannt und zwar einheitlich von den tiefen Lagen des Mittelmeergebietes bis in die Hochalpen, so daß man die Spezialisierung trotz der noch nicht allzu

hohen Zahl von Funden als gesichert ansehen darf. Die Pflanze zeigt äußerlich meist nur ihre mit einem braunen Lagerrand umgebenen roten Apothecien, selten kleine Lagerschuppen. Die Fruchtkörper können sowohl aufsitzen, wie auch ± eingesenkt sein. Sogar eine völlig vom Wirtsgewebe umschlossene, allerdings funktionsunfähige Frucht

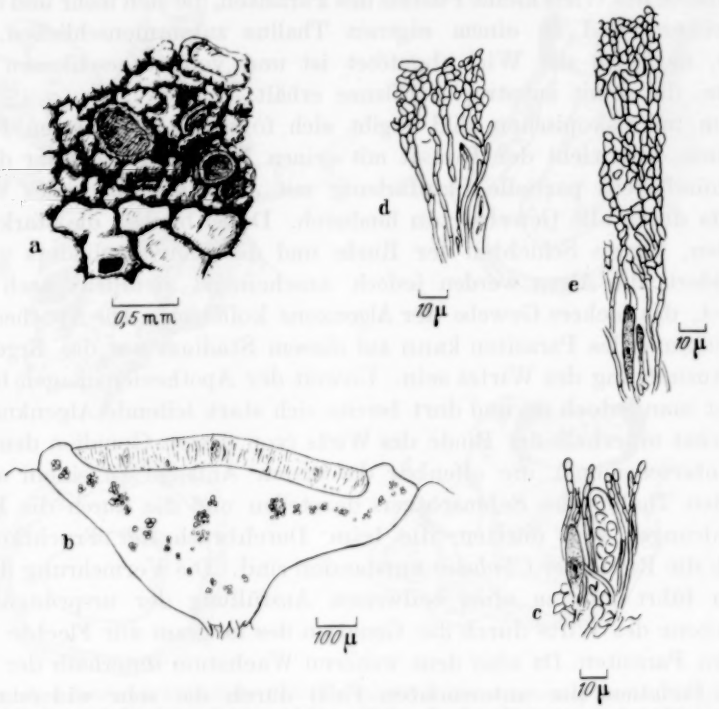


Abb. 3a—e. *Caloplaca congrediens (Nyl.) Zahlbr.* auf *Candelariella vitellina (Ehrh.) Müll. Arg.* (Findlingsblock unweit Perchting Kreis Starnberg, 5. 1953, leg. J. Poelt). a Habitus. Unten Thallus von *Lecanora (Asp.) cinerea (L.)* Smrft. mit einem (schwarzen) Apothecium, darauf die kleineren, körnigen Lagerschuppen der *Candelariella*, mit einem Fruchtkörper ganz oben. Zwischen den Schuppen die dunkleren Apothecien der parasitischen *Caloplaca*-Art. b Schnitt durch Lager und Apothecium des Schmarotzers, sichtbar die deutliche Abgrenzung gegen den Wirt sowie das in diesen eindringende Hyphenbündel. c Ausschnitt aus einem normalen, d und e aus einem vom Wirtslager umschlossenen Hymenium. Die Hyphen sind lang ausgewachsen und bilden eine Art deckendes Füllgewebe.

(mit nach oben ausgewachsenen Paraphysen, die ein etwa hymeniumdickes Füllgewebe bildeten) wurde beobachtet.

Mikrotomschnitte ergaben folgendes Bild: Der Schmarotzer sitzt mit einem pfropfenartigen Thallus im Wirtsgewebe. Er enthält noch ziemlich viele, allerdings meist cytoplasmaarme, also anscheinend wenig funktionstüchtige Gonidien. Wirt und Parasit sind durch beiderseitige Rinden gegeneinander abgegrenzt, deren Hyphen äußerst plasmareich sind, was auf starke stoffliche Aktivität zu deuten scheint. Lediglich

vom unteren Ende des besagten Lagerpfropfens aus erstreckt sich ein dickes Hyphenbündel in den Thallus des Wirtes hinein, dessen weiterer Verlauf allerdings wegen der Gleichartigkeit der Hyphen beider nicht festgestellt werden konnte. Der Schmarotzerthallus ist oberseits zum größten Teil von einem Fruchtkörper ausgefüllt, der in seiner Lagerberandung ebenfalls plasmaarme Algen trägt. Es konnte nicht geklärt werden, ob die noch grünen Chloroplasten dieser Algen eine Reduktion erfahren haben. Unterhalb des Hymeniums zeigt sich ein starkes Streckungswachstum (hier mitunter auch plasmareiche Algen!), das nötig erscheint, um von den raschwachsenden Lagerschuppen des Wirtes, der an sehr stickstoffreichen Plätzen gedeiht, nicht überwölbt zu werden. Letzterer läßt, wie schon hieraus hervorgeht, keinerlei Minderung der Lebensfähigkeit erkennen. Im Gegenteil hat man oft den Eindruck, als habe der Schmarotzer alle Mühe, nicht von seinem Ernährer erdrückt zu werden.

Als letzter Fall sei die merkwürdige, vor nicht sehr langer Zeit erst entdeckte *Rinodina soredicola Degelius* (s. Abb. 4; vgl. Degelius S. 405 sowie Magnusson 4, S. 269) behandelt, die bislang nur als Bewohner der Sorale von blaualgenhaltigen Blattflechten in Skandinavien und den Alpen bekanntgeworden ist. Unbefallene Sorale der häufigsten Unterlage, *Lobaria scrobiculata (Scop.) DC.*, zeigen feinkörnige bis verlängerte Soredien von charakteristisch blaugrauer Färbung. Auf befallenen Lagern werden die Soredien gröber und färben sich durch Rindenbildung braun. Auf diesen nunmehr isidiösen Bildungen, die dann und wann zu Lappen auswachsen können, sitzen nun verstreut die in der Farbe völlig gleichen Apothecien der besagten *Rinodina*-Art. Man möchte oberflächlich gesehen die braunen Soralkörner für Thallusteile des Parasiten betrachten, doch wird man durch eine kurze Untersuchung belehrt, daß sie nur Cyanophyceen enthalten und somit vom Wirt stammen müssen, was auch eine Prüfung der Rindenanatomie bestätigen kann.

Schnitte durch die befallenen Lager zeigten ein ziemlich verwirrendes Bild, weil sich hier im Wirtsthallus neben der *Rinodina* noch Lager der vielleicht auch fakultativ parasitischen *Caloplaca stillicidiorum (Vahl) Lynge* vorfanden, ferner die Hyphen von drei pilzlichen Flechtenparasiten und zu den beiden Gonidientypen noch eine weitere endophytische Blaualge. Die ersten Thallusanfänge der *Rinodina* stellen sich als winzige rundliche Gebilde aus wenigen von einem Hyphengeflecht umsponnenen Algen dar, die mit Einzelhyphen in der Wirtsrinde verankert sind; gerne setzen sie sich überhaupt in Rissen derselben fest. Die Hyphen dringen im Laufe der Entwicklung bis zur Gonidienschichte des Wirtes durch und bewirken dort ein partielles Absterben der Algen. Leider konnte die Apothecienentwicklung nicht

verfolgt werden. Die Fruchtkörper sitzen jedenfalls schließlich fast ohne Lager auf den isidiösen Soredien des Wirtes auf. Man kann sich hier denken, daß das Aufbrechen der Rinde durch den Parasiten eine Soralbildung induziert, doch läßt sich hierfür kein Beweis führen. Auf

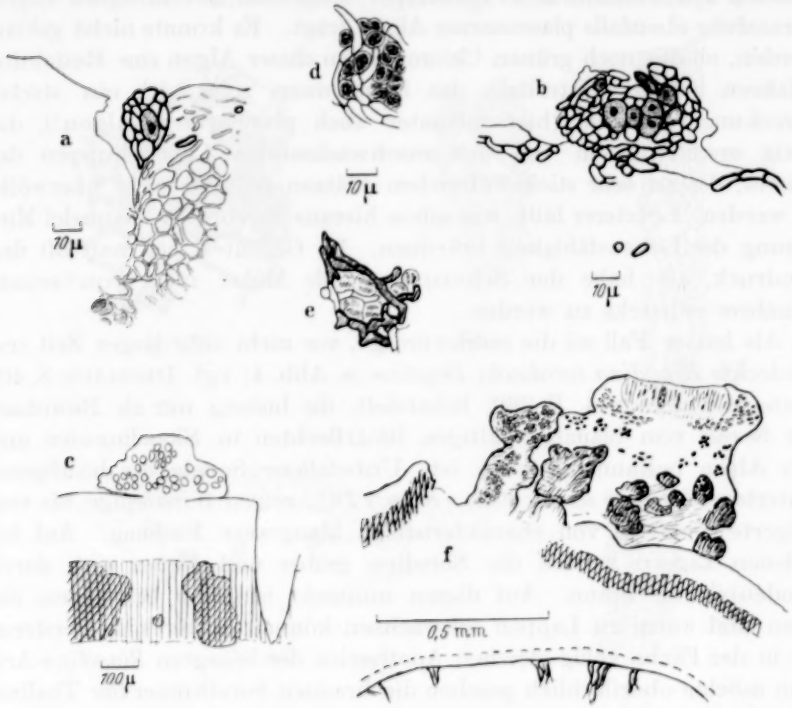


Abb. 4a—f. *Rinodina soredicola Degel* auf *Lobaria scrobiculata* (Scop.) DC. (Torne Lappmark, Kirchspiel Jukkasjärvi, Rautasjärvi, Kittjatjåkko, östlichster Teil, Kalkblock in der Birkenstufe, nahe der Waldgrenze; 8. 1947, leg. T. E. Hasselrot.) a u. b Erste Thallusanfänge des Parasiten; a in einem Riß, b auf der Oberfläche der Wirtsrinde, plasmareiche Algen enthaltend. Die Hyphen sind dickwandig und gut färbbar; c etwas älterer Thallus. Die unter ihm liegende Algenschicht der *Lobaria* ist teilweise abgestorben; doppelt schraffiert noch lebende Algengruppen; d diese im Ausschnitt dargestellt; e abgetötete Partien ebenso vergrößert, hier gut sichtbar die dunklen Parasitenhyphen; f Schnitt durch ein späteres Entwicklungsstadium. Unten der Wirt, seine Algenzone schraffiert; darauf berindete, dunkel gefärbte Soredien mit zum Teil lebenden, zum Teil abgestorbenen Cyanophyceen. Unter dem Apothecium des Parasiten, das im Rand eigene Grünalgen enthält, abgetötete Blaualgengruppen des Wirtes.

jeden Fall scheint der Parasit nur sehr kümmerliche Lagerkörnchen auszubilden; die Ernährung dürfte zum allergrößten Teil vom Wirte besorgt werden, der selbst nur wenig geschädigt wird.

Systematische und räumliche Verteilung.

Von Interesse mag ein Überblick über die Verwandtschaftskreise sein, aus denen sich Parasiten und Wirte herleiten. Was die ersteren

betrifft, so stehen die Gattungen *Acarospora*, *Caloplaca* und wohl auch *Buellia* weit voran, deren übrige Angehörige zumindest zum großen Teil als sehr nitrophil betrachtet werden müssen. Ihnen folgt das ökologisch sehr vielseitige, polyphyletische Genus *Lecanora*, die biologisch recht aktive Gattung *Diploschistes* sowie die Gruppe der *Coniocarpineen*, bei denen die biologische Grenze zwischen Pilz und Flechte überhaupt sehr schlecht festzulegen ist.

Unter den Wirten steht die Untergattung *Aspicilia* von *Lecanora* mit ihren meist nitrophoben Arten zahlenmäßig an erster Stelle, gefolgt von *Lecidea*, einem ebenfalls durchschnittlich nitrophoben Genus, sowie *Lecanora* i. e. S. Aus der Auswahl der übrigen Wirte läßt sich kein zusammenhängender Gesichtspunkt herauslesen. Strauch- und Laubflechten sind kaum beteiligt.

Generell läßt sich also sagen, daß sich die parasitischen Flechten aus nitrophilen Verwandtschaftskreisen heraus rekrutieren, während die Wirte meist von nitrophoben Gruppen gestellt werden.

Die geographische Verbreitung zeigt ein deutliches Überwiegen des Schmarotzertums unter den Flechten in den trockenheißen Gebieten, in Europa im Mittelmeerraum, wo noch mehrere Fälle der Aufklärung harren. Aus zwei innerasiatischen Sammlungen beschreibt Magnusson (2 u. 3) allein über 10 neue parasitische Arten. Soweit aus spärlichen Hinweisen ersichtlich, scheint ein gleiches für andere xerische Länder zu gelten. In zweiter Linie folgen die arktischen und borealen Gebiete. Parasiten über Rindenflechten scheinen zu den großen Ausnahmen zu gehören und so ist diese biologische Gruppe in den Waldgebieten schlecht vertreten. Aus den Tropen liegen den Verf. kaum Angaben vor, doch sei darauf hingewiesen, daß Santesson unter den blattbewohnenden Flechten sehr viele parasymbiontische Arten anführt, die sich nach dem Gesagten wohl als reduzierte Lichenen auffassen lassen.

Die hier erörterten Daten scheinen uns für ein zweifellos parasitisches, nicht parasymbiontisches Verhältnis von Flechten zu anderen Flechten zu sprechen, wenn vorderhand auch völlig dahingestellt bleiben muß, welche physiologischen Beziehungen diesen „Symbiosen" (im weitesten Sinne) zugrunde liegen. Die vordem so stark betonte biologische Trennung zwischen autotrophen (Flechten) und heterotrophen (Pilze) Fungi, die vielfach als Grundlage zur generischen Scheidung sonst völlig gleichgestalteter Flechtenpilze gedient hat, verliert somit schon im Bereich der Flechten selber an Bedeutung. Die polytopen Übergänge zwischen Autotrophie und Heterotrophie, hier also Parasitismus und Parasymbiose, sind, ähnlich wie bei Blütenpflanzen und Algen, fließend. Es wäre ja auch merkwürdig, anzunehmen, das (phyletisch festgelegte) Vorhandensein von Gonidien würde den Pilz

der Fähigkeit berauben, parasitisch zu leben, was dann nahestehende Verwandte ohne weiteres zu tun vermögen. Daß übrigens auch die Grenzen zwischen autotrophem und saprophytischen Pflanzenleben verschwimmen, kann das Verhalten des kleinen *Thelocarpon epibolum Nyl.* lehren, das gelegentlich auf anorganischem Substrat als Flechte gefunden wurde, doch am sichersten auf absterbenden Thalli von *Peltigeraceen* zu entdecken ist, hier ohne Algen und offensichtlich saprophytisch vegetierend.

Abb. 5. Mehrstufiger Parasitismus (Griechenland: Auf offenen Kalkblöcken auf dem Parnis bei Athen, ± 1000 m, 4. 1954, leg. J. Poelt). Die Hauptfläche des Bildes ausgefüllt von der weißen *Lecanora (Asp.) farinosa* (Flk.) Nyl. Der breite Saum der zentralen Partie wird von den orangefarbenen Lappen der parasitischen *Caloplaca* eingenommen, die ihrerseits zum großen Teil von einer unbestimmbaren braunen Krustenflechte (dicke Areolen in der Mitte) zerstört ist. Auf dieser wiederum sitzen die noch jungen, hellen Apothecien von *Lecanora sp.* (bes. oben Mitte). Durchmesser der dunkleren Partie etwa 6 mm.

Freilich ist dieses Verfließen der biologischen Grenzen in phyletischem Sinne nur in einer Richtung, nämlich reduktiv zu lesen, soweit es die echten Flechten der Ordnung *Lecanorales* sens. ampl. betrifft. Das Parasitieren von Flechten auf anderen Lichenen steht auf halbem Weg zur echten Parasymbiose der eigentlichen Flechtenparasiten, die in dieser Sicht erst verstanden werden kann.

Es ist unter den Pilzen keine Seltenheit, daß parasitische Sippen ihrerseits wieder von Schmarotzern befallen werden, das Schmarotzertum also topographisch und biologisch gewissermaßen mehrstufig wird. Daß ein ähnliches Verhalten auch bei Flechten vorkommt, mag Abb. 5 belegen. Zu unterst sitzt ein Lager der epilithischen *Lecanora (Asp.) farinosa (Flk.) Nyl.*; dieses ist (gleichwie ein benachbartes *Placodium*) von einer sehr virulenten, im Mittelmeergebiet mehrfach gesammelten, aber noch nicht geklärten *Caloplaca*-Art befallen, die ihre Opfer seitlich entlang von Thallusrissen usw. anzugreifen pflegt; die letztere wiederum wurde von der Mitte her bis auf wenige Reste am Rande von einer ähnlich aktiven braunen Kruste aufgezehrt, welche zu den pyrenocarpen Flechten gehören dürfte (der Versuch einer Bestimmung würde die Zer-

störung der Objekte bedeuten!); den Beschluß machen Apothecien einer *Lecanora*-Art, die sich ohne Lager auf der letztgenannten Kruste entwickeln. Im ganzen sitzen hier also vier Flechten aufeinander, davon drei parasitische, von denen jeweils die stärkere die schwächere ± aufzehrt. Dies mag als Hinweis dafür gelten, welche große Rolle der Parasitismus *innerhalb* der Flechten spielt, wie kompliziert die Verhältnisse tatsächlich sind, wie wenig aber darüber noch bekannt ist.

Zusammenfassung.

Eine nicht unbedeutende Anzahl von Flechten besitzt die Fähigkeit, auf anderen Flechtenarten zu parasitieren. Nach ihrem Verhalten zu den Wirten können dabei einige Gruppen von Parasiten unterschieden werden.

Gelegenheitsparasiten greifen konkurrenzschwächere Arten an und töten sie ab. Sie verhalten sich unspezifisch und unökonomisch.

Jugendparasiten beginnen ihre Entwicklung als ± virulente, teilweise spezialisierte Schmarotzer, um im Laufe der Entwicklung einen eigenen Thallus aufzubauen, also erst zur Flechte zu werden.

Obligate Parasiten leben zumindest die längste Zeit als sich ± ökonomisch verhaltende Schmarotzer. Eine Anzahl von ihnen befällt unspezifisch Flechten sehr verschiedener Verwandtschaft, der größere Teil ist aber ± spezialisiert.

Bei vielen Arten der letzterwähnten Gruppe ist eine ± weitgehende Thallusreduktion festzustellen (vergleichbar der Blattreduktion bei heterotrophen Blütenpflanzen).

Die bei extremen Parasiten im Thallus bzw. Lagerrand der Apothecien vorkommenden Algen sind vielfach gegenüber den Gonidien autotropher Flechten cytoplasmaarm, in ihrer Vitalität deutlich herabgesetzt.

Von den parasitischen Flechten aus läßt sich ohne weiteres sowohl biologisch als auch systematisch eine Brücke schlagen zu den echten Flechtenparasiten; die Übergänge sind fließend. Reduzierte Angehörige lecanorinisch berandeter Gattungen werden wegen ihrer rudimentären Algen im Lagerrand noch als Flechten aufgefaßt, während im Thallus gleichstark reduzierte lecideinisch berandete Sippen wegen des Fehlens von Gonidien als Pilze betrachtet werden. Die letzte Gruppe stellt demnach eine große Gruppe von Flechtenparasiten.

Flechten und echte Flechtenparasiten bilden auch in dieser Sicht eine systematische Einheit.

Die schmarotzenden Flechten rekrutieren sich vor allem aus nitrophilen Gattungen, während die Mehrzahl der Wirte nitrophoben Verwandtschaftskreisen entstammt.

Parasitische Flechten treten am zahlreichsten in trockenwarmen Gebieten auf Gesteinsflechten auf.

Ein Fall „mehrstufigen" Schmarotzertums wird geschildert.

Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* hat der jüngere Autor für eine Sachbeihilfe zu danken. Den Herren Dr. G. Degelius und P. O. Lindah sind wir für Überlassung einiger Flechtenproben zu Dank verpflichtet.

Literatur.

Arnold, F.: Flora (Regensburg), N. F. **32**, 82 (1874). — Degelius, G.: Bot. Not. (Lund) **1945**, 390. — des Abbayes, H.: Traité de Lichénologie. Encycl. Biol. **41** (1951). — Keissler, K. v.: (1) Die Flechtenparasiten. In Rabenhorsts Kryptogamenflora, Bd 8. Leipzig 1930. — (2) Flechten. In Rabenhorsts Kryptogamenflora, Bd. 9, 1. Abt., Teil 2. Pyrenulaceae bis Coniocarpineae. Leipzig 1938. — Lettau, G.: Fedde Rep. spec. nov. Beih. **69**, 2 (1937). — Magnusson, A. H.: (1) Kgl. Sv. Vetenskapsakad. Hdl., 3. Ser. **7**, Nr 4 (1929). — (2) Rep. Sci. Exped. NW-China Sven Hedin (The Sino-Swedish Exped.) **11**, 1 (1940). — (3) Rep. Sci. Exped. NW-China Sven Hedin (The Sino-Swedish Exped.) **11**, 2 (1944). — (4) Medd. Göteb. Bot. Trädg. **17**, 191 (1947). — Minks, A.: Verh. zool.-bot. Ges. Wien **42**, 377 (1892). — Nannfeldt, J. A.: Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis, Ser. IV 8, Nr 2 (1932). — Poelt, J.: Mitt. bot. Staatssammlg. München **1953**, H. 6, 236. — Santesson, R.: Foliicolous Lichens I. Symbolae bot. Upsalienses **12**, 1 (1952). — Tobler, F.: Jb. wiss. Bot. **49** (1911).

Dr. Josef Poelt, Botanische Staatssammlung,
und Hans Doppelbaur, Botanisches Institut,
München, Menzinger Str. 67.

Planta, Bd. 46, S. 481—511 (1956).

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin.

ZUR ANALYSE DER GRANULA-FLUOROCHROMIERUNG MIT NILBLAU IN DEN HYPHEN VON *MUCOR RACEMOSUS* FRES.*

Von

HERBERT GUTZ.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. August 1955).

Einleitung.

In den Oberepidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa* lassen sich die Sphärosomen (Mikrosomen, vgl. DRAWERT 1955) mit Nilblausulfat, Janusgrün B und Berberinsulfat elektiv vital fluorochromieren (DRAWERT 1952, 1953). Während die beiden zuletzt genannten Farbstoffe nur bei Sauerstoffmangel eine Sphärosomenfluorescenz bedingen, schien für die Fluorochromierung mit Nilblausulfat die Sauerstoffspannung von untergeordneter Bedeutung zu sein. Bei Versuchen mit Mycel von *Mucor racemosus* Fres. stellte sich dann aber heraus, daß auch die durch Nilblausulfat hervorgerufene „Sphärosomen"-Fluorescenz unter Umständen stark sauerstoffempfindlich sein kann (DRAWERT und GUTZ 1953). Das Alter einer Farbstofflösung konnte hierfür von ausschlaggebender Bedeutung sein. Es ergab sich daher die Notwendigkeit, den Einfluß der verschiedenen Faktoren auf die Fluorochromierung mit Nilblau eingehend zu untersuchen. Als Hauptuntersuchungsobjekt wurde das Mycel von *Mucor racemosus* gewählt, da die Hoffnung bestand, aus den erhaltenen Ergebnissen auch etwas über die Natur der Granula in Pilzhyphen aussagen zu können. Für die Untersuchungen wurden Nilblaupräparate unterschiedlicher Herkunft herangezogen, da man mit der Möglichkeit rechnen mußte, daß sich verschiedene Präparate abweichend voneinander verhalten können.

1. Literaturübersicht.

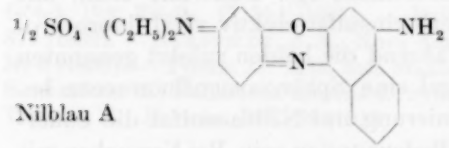
a) Chemische und chemisch-physikalische Eigenschaften von Nilblau.

Der basische Oxazinfarbstoff Nilblau kommt unter den Bezeichnungen Nilblausulfat, Nilblauchlorhydrat, Nilblau A, Nilblau BB u. a. in den Handel. Die einzelnen Fabrikate sollen sich z. T. durch andere Substituenten an der einen Aminogruppe unterscheiden und Sulfate oder Chloride sein (THORPE 1907, LETORT 1932, SPEK 1943a).

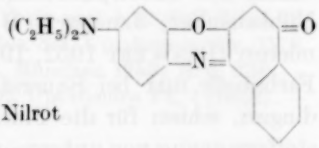
* Auszug aus einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin.

SMITH (1908) führte das Nilblausulfat in die Histologie als Fettfarbstoff ein. Wäßrige Nilblausulfatlösung färbt die Fetttropfen in Geweben meist rot, gelegentlich auch blau oder in einer Mischfarbe davon an. SMITH vermutet, daß die Rotfärbung für Neutralfette, die Blaufärbung für Fettsäuren spezifisch ist. Diese Spezifität wurde später von vielen Autoren bezweifelt; es sei auf die zusammenfassenden Darstellungen bei ROMEIS (1948, § 1064/67) und LISON (1953, S. 367 ff) und auf die Untersuchungen von LENNERT u. WEITZEL (1952) verwiesen.

Nach THORPE (1907) und SMITH (1908) enthält die wäßrige Nilblausulfatlösung stets zwei verschiedene Substanzen, die man durch Ausschütteln mit Xylol oder anderen organischen Lösungsmitteln trennen kann. Das Xylol färbt sich rot und fluoresciert intensiv gelb, die wäßrige Phase bleibt blau. THORPE gelingt es, durch Ansäuern, Erhitzen und Ausschütteln mit Xylol die hydrophile blaue Substanz in die lipophile rote umzuwandeln. Das so erhaltene Präparat stimmt mit dem von MÖHLAU u. UHLMANN (1896) beschriebenen 3-Diäthylaminophenonaphthoxazon (gleich 7-Diäthylamino-3,4-benzo-phenoxazon-(2) in BEILSTEIN 1937) überein. Nach THORPE wird dabei im Nilblau A die Aminogruppe in der 6-Stellung durch Sauerstoff substituiert:



Nilblau A



Nilrot

Aus Nilblau A als Substanz kann kein Oxazon extrahiert werden, erst beim Lösen in Wasser bilden sich geringe Mengen davon.

Nach THORPE und SMITH bestehen folgende Unterschiede zwischen dem Nilblau-Oxazon und der Nilblau-Base: Die Base läßt sich nur aus alkalischen Nilblaulösungen mit Xylol ausschütteln, das Oxazon dagegen auch aus sauren. In Xylol gelöstes Oxazon fluoresciert stark gelb, die in Xylol gelöste oxazonfreie Base fluoresciert dagegen nicht.

Das Oxazon des Nilblaus wird von LISON (1935, 1953) Nilrot („rouge de Nil") genannt, es soll in kaltem und kochendem Wasser unlöslich sein und eine sehr schwache Base darstellen.

Bei der Fettfärbung mit Nilblausulfat ruft das Oxazon die Rotfärbung der Neutralfette hervor und die Nilblaubase bildet mit den Fettsäuren Nilblauoleate, wodurch diese blau erscheinen (SMITH). Nach THORPE und SMITH verhalten sich Nilblau BB, Neumethylenblau GG, Meldolas Blau und Neublau B gleich bzw. ähnlich wie Nilblau A.

Trotz der grundlegenden Untersuchungen von THORPE und SMITH vertreten die meisten folgenden Autoren (EISENBERG 1910; weitere Literatur bei LISON 1935) die Ansicht, daß die Rotfärbung der Neutralfette nicht durch das Nilblau-Oxazon, sondern durch die Nilblaubase hervorgerufen wird, die sich auf Grund ihrer Lösungsaffinität in den Neutralfetten anreichert (EISENBERG). Erst LISON (1935; 1953, S. 367 ff) bestätigt in sorgfältigen Nachuntersuchungen wieder die Befunde von THORPE und SMITH. Nach LISON ist im Nilblau des Handels immer Nilrot enthalten, allerdings als in Toluol unlösliches Nilrotsulfat. Bei der Auflösung in Wasser wird durch Hydrolyse die in Toluol lösliche Nilrotbase frei. Den Widerspruch, daß mit solchen Lösungen eine Fettfärbung erhalten wird, obwohl die Nilrotbase in Wasser völlig unlöslich sein soll, versucht LISON (1935) folgendermaßen zu lösen: «Il est probable qu'une partie tout au moins du rouge Nil est maintenue en solution à l'état de sulfate grâce à la présence en grand excès de sulfate de bleu de Nil; celui-ci

agit par ses ions SO_4, de façon à faire rétrograder la dissociation du sulfate de rouge de Nil, conformément à la loi d'action des masses.» Das Nilrot entsteht nach Lison in wäßrigen Nilblaulösungen, die durch mehrmaliges Ausschütteln mit Toluol vom Nilrot befreit worden sind, immer wieder aufs Neue aus dem Nilblau.

Die zitierten Autoren verwendeten im allgemeinen 1%ige bis gesättigte Nilblaulösungen. Da Nilblausulfat das Salz einer starken Säure und einer schwachen Base ist, reagieren solche Lösungen durch Hydrolyse stark sauer, und mit Toluol, Xylol usw. kann daraus nur das Nilrot, nicht aber die Nilblaubase ausgeschüttelt werden. Diese Tatsache muß beim Vergleich mit den noch zu besprechenden Vitalfärbungsergebnissen berücksichtigt werden, weil hier das Nilblau in starker Verdünnung angewendet wird. Aus verdünnten wäßrigen Lösungen läßt sich auch die Nilblaubase mit Toluol und anderen hydrophoben Medien ausschütteln.

Wäßrige Nilblausulfatlösungen können mit $Na_2S_2O_4$ oder mit aktiviertem Wasserstoff reduziert werden (Cohen u. Preisler 1931). Die reduzierten Lösungen sind von p_H 1—8,4 farblos bis strohgelb, ab p_H 9 rötlich. Sie werden bei $pH > 6{,}4$ durch den Luftsauerstoff leicht reoxydiert, während im stärker sauren Bereich die Reoxydation nur langsam erfolgt. Das reduzierte Nilblausulfat ist in Form von weißen, in Wasser leicht löslichen Nadeln erhältlich (Möhlau u. Uhlmann, Cohen u. Preisler).

Nach Cohen u. Preisler ist das Nilblausulfat des Handels (Nilblau A) auf Grund seines Oxazongehaltes für Redoxpotentialmessungen nicht geeignet. Die Autoren extrahieren deshalb das Oxazon erst mit Äther. Aber auch diese gereinigten Substanzen besitzen die Neigung, sich in wäßrigen Lösungen zu zersetzen: "Strictly speaking, therefore, these compounds remain pure only if kept out of contact with water." — Nach weiteren Angaben von Cohen u. Preisler liegt der Farbstoff in wäßrigen Lösungen in kolloidaler Form vor, die Lösungen zeigen einen Tyndalleffekt. Bei hohen Farbstoffkonzentrationen kommt es zu kolloidalen Ausfällungen. Die im sauren Bereich (bis pH 7) in 10^{-4}—10^{-5} mol Lösungen auftretende Kolloidbildung kann durch Verdünnung bzw. alkalische Reaktion rückgängig gemacht werden. Das Absorptionsmaximum einer $9 \cdot 10^{-4}$ mol Lösung verschiebt sich bei Verdünnung in das langwelligere Gebiet. Parallel zu diesen Erscheinungen zeigt das Redoxpotential eine Konzentrationsabhängigkeit.

Ferner ist Nilblau ein pH-Indicator. Die wäßrigen Lösungen von Nilblau A und Nilblau B sind rein blau; bei Zugabe von Lauge tritt ein Farbumschlag nach Rot ein, bei Zugabe von Salzsäure schlägt der Farbton über Grün nach Gelb um, während Essigsäure keine Farbänderungen hervorruft (Czaja 1934). Der pH-Bereich des Umschlages von Blau nach Rot liegt je nach Herkunft des Farbstoffes verschieden (Drawert 1952). Die bei Zugabe von Laugen in rotbraunen Flocken ausfallende Farbbase ist nicht in Wasser, sondern nur in organischen Lösungsmitteln löslich (Möhlau u. Uhlmann).

Drawert (1940, 1952) prüft in Ausschüttelungsversuchen mit hydrophoben Lösungsmitteln die Abhängigkeit der Lipoidlöslichkeit des Nilblaus vom pH-Wert der wäßrigen Farblösungen. Die Lipoidlöslichkeit des Nilblaus nimmt mit abnehmender cH der wäßrigen Phase zu. Die in den hydrophoben Medien auftretende rötliche Fluorescenz schreibt Drawert (1952) der Farbbase zu.

Nach Spek (1940, 1943a, b) zeigen wäßrige Nilblausulfatlösungen eine ganz schwache Rotfluorescenz. Wird das Farbsalz in wasserfreien organischen Medien, die lipophile und hydrophile Gruppen enthalten, gelöst, so tritt eine starke rote Fluorescenz auf, die bei Zugabe von Wasser erlischt. In rein lipophilen Substanzen ist nur die Farbbase, nicht das Farbsalz löslich. Durch deutliche Unterschiede im Spektrum kann festgestellt werden, ob das Farbsalz des Nilblausulfates in einer lipoiden oder in einer wäßrigen Phase gelöst ist. — Wird wäßrige Nilblausulfat-

lösung mit Natriumhyposulfit reduziert, so tritt eine intensive gelbe Fluorescenz auf (DRAWERT 1952). Nilblau zeigt auch die Erscheinung der Metachromasie, Literaturangaben darüber finden sich bei DRAWFRT (1952).

b) Vitalfärbungen mit Nilblau.

Lebende Zellen speichern das Nilblau je nach dem pH-Wert der Farblösung in der Vacuole oder in der Membran, aber auch Plasma- und Kernfärbungen treten auf (GUILLIERMOND 1922, 1940, 1941; GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1940/46; DRAWERT 1940; BUCHY 1941). In den Oberepidermiszellen von *Allium*-Schuppenblättern beginnt die Vacuolenfärbung bei pH 7—8 (DRAWERT 1940, 1952), in Hefezellen aber bereits bei pH 3,5 (GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1940/46).

Auch bei *Phycomyces blakesleeanus* wird nach JOHANNES (1940) Nilblausulfat ebenso wie Neutralrot je nach der cH des Außenmediums in den Membranen oder in Form von Tröpfchen im Zellinnern gespeichert. In jungen Hyphen liegt der Umschlagspunkt von der Membran- zur Tröpfchenfärbung etwa bei pH 7, in alten Hyphen etwa bei pH 9.

Mit Nilblau gefärbte Wurzeln höherer Pflanzen wachsen unter Beibehaltung der Vacuolenfärbung weiter. Im Gegensatz dazu scheiden vitalgefärbte Pilze i. a. erst die gespeicherten Farbstoffe aus, ehe sie ihr Wachstum fortsetzen (GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1938a, b, c; 1940/46).

Von lebenden Hefen (AUBEL u. GENEVOIS 1927; GUTSTEIN 1929; GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1938c, 1940/46) und anderen Pilzen *(Saprolegnia, Oidium lactis)* (GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1938a, 1940/46) und von Protozoen *(Opalina)* (BECKER 1926) wird Nilblau unter Entfärbung reduziert; *Allium*-Epidermiszellen sind nach GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1940/46) dazu nicht befähigt. Die Reduktion findet im alkalischen Medium schneller als im sauren statt (GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1940/46 sowie BUCHY 1941).

JOYET-LAVERGNE (1928, 1932) verwendet Nilblau und reduziertes Nilblau bei seinen Untersuchungen über die Sexualität; ferner benutzt der Autor (1934) reduziertes Nilblau zur Färbung der Chondriosomen. GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1940/46) behandeln Hefe mit reduziertem Nilblau und beobachten, daß nach Reoxydation des Farbstoffes Vacuolen- bzw. Plasmafärbung vorhanden ist. Es färben sich demnach dieselben Zellbestandteile, die auch sonst von Nilblau angefärbt werden. Die Autoren schließen daraus, daß die reduzierte Form des Farbstoffes an denselben Orten in der Zelle wie die oxydierte Form angehäuft wird.

Angaben über die Giftigkeit des Nilblaus machen GUILLIERMOND (1930) und GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1938a, b, c; 1940/46). Nilblau gehört zu den verhältnismäßig wenig giftigen Vitalfarbstoffen; für Pilze ist es aber giftiger als für Wurzeln höherer Pflanzen. Reduziertes Nilblau besitzt eine geringere Giftigkeit als oxydiertes. KELLER u. GICKLHORN (1932) rechnen Nilblausulfat ebenfalls zu den wenig giftigen Farbstoffen. Für *Aspergillus niger* soll es dagegen nach STEINBERG (1940) stark giftig sein.

Wie bereits erwähnt, stellt DRAWERT (1952, 1953) bei der fluorescenzmikroskopischen Analyse der Nilblausulfatfärbung eine elektive goldgelbe Fluorochromierung der Sphärosomen fest. Neben den hauptsächlich benutzten *Allium*-Epidermen zeigt auch eine Reihe anderer Objekte mit Nilblausulfat Sphärosomenfluorescenz (Sph.-Fl.). Diese tritt im ganzen geprüften pH-Bereich auf (pH 2,1—9,2). Zur Erklärung der Sph.-Fl. zieht DRAWERT die Möglichkeit in Betracht, daß der Farbstoff von der lebenden Zelle reduziert wird und daß die reduzierte Stufe die Fluorescenz hervorruft. Da andererseits aber die Sphärosomen nicht nur in lebenden, sondern auch in toten Zellen fluorochromiert werden und im Modellversuch die in lipophilen Stoffen gelöste Farbbase intensiv fluoresciert, gelangt DRAWERT zu der

Ansicht, daß für das Auftreten der Sph.-Fl. Reduktionsvorgänge keine oder doch nur eine untergeordnete Bedeutung haben. Für diese Auffassung schien auch die Tatsache zu sprechen, daß die Sph.-Fl. nicht durch O_2-haltiges Wasser oder durch 3% H_2O_2 gelöscht werden konnte (DRAWERT 1953). Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse kommt DRAWERT (1952) zu der Schlußfolgerung, daß die Fluorochromierung der Sphärosomen mit Nilblausulfat auf einer Lösung der Nilblaubase in einer lipoiden Phase beruht. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, stellte es sich dann aber heraus, daß auch mit Nilblau unter Umständen eine stark sauerstoffempfindliche Granulafluorescenz auftreten kann (DRAWERT u. GUTZ 1953).

2. Material und Methodik.

Für die Versuche benutzte ich submers gezogenes Mycel von *Mucor racemosus* Fres., da sich dieses besser zur Vitalfärbung eignet als die auf festem Nährboden kultivierten Hyphen. Eine Einsporkultur von einem Stamm der hiesigen Institutssammlung diente als Ausgang für den benutzten Klon. — Für Vergleichsversuche wurden noch Mycelien von *Basidiobolus ranarum* Eid. und *Penicillium chrysogenum* Thom. sowie Bäckerhefe und die Oberepidermen der Schuppenblätter der Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.) herangezogen.

Die Stammkulturen der Pilze kultivierte ich bei Zimmertemperatur auf Agar-Nährböden (Schrägröhrchen). Die Heranzucht der für die Versuche benötigten Mycelien geschah dagegen in Nährlösung bei 24,5° im Thermostaten bei diffusem Tageslicht, da das Wachstum von *Mucor racemosus* im Dunkeln gehemmt ist.

Bei der Heranzucht des *Mucor*-Mycels für die Versuche ging ich von 4—10 Tage alten Malzagar-Kulturen aus. Die Sporen dieser Kulturen dienten zur Beimpfung der Nährlösungen. Der Pilz wuchs sehr schnell, bereits nach ungefähr 18 Stunden war ein größeres aber lockeres submerses Mycel vorhanden. Blieben die Kulturen länger stehen, stieg ein Teil des Mycels an die Oberfläche und bildete dort Sporangien. Für die Färbung wurden die der Nährlösung entnommenen Hyphen erst in Leitungswasser bzw. Puffergemisch abgespült und dann in die entsprechende Farblösung überführt. Nach Ablauf der Färbezeit erfolgte ein erneutes Abspülen und die Untersuchung in Leitungswasser bzw. in Pufferlösung. In manchen Fällen war es günstig, das Mycel zur Beobachtung in der Farblösung zu belassen. Zur Herstellung der Phosphatpuffer und der gepufferten Farblösungen dienten die Angaben von STRUGGER (1949, S. 134f). Die pH-Werte wurden mit der Glaselektrode gemessen.

Die laufenden fl.mikrosk. Untersuchungen wurden mit einem Zeiss-Winkel-Standardmikroskop in Verbindung mit einem Mikroprojektionsgerät der gleichen Firma durchgeführt, das mit einer Kohlenbogenlampe (Gleichstrom, 115 V, 6 A) von genügender Lichtintensität ausgestattet ist. Den UV-undurchlässigen Kondensor des Mikroskops ersetzte ich durch einen älteren Phasenkontrastkondensor der Firma Zeiss, Jena, der bei Schaltung auf Hellfeld eine ausreichende UV-Durchlässigkeit besitzt. Es war erforderlich, zusätzlich zur Kühlküvette der Mikroprojektionseinrichtung noch eine Küvette mit Kupfersulfatlösung in den Strahlengang der Beleuchtung einzuschalten. Blaulicht erzielte ich mit dem Filter BG 12 (Dicke 4 mm) und UV mit dem Filter UG 1 (Dicke 1,5 mm). Als Okularsperrfilter dienten im Blaulicht das Filter OG 5 und im UV ein Euphosglas (UV 1,2). Alle in der Arbeit angeführten Fluorescenzfarbtöne beziehen sich auf die Filterkombination UG 1 + UV 1,2. Durch die Benutzung des Phako-Kondensors konnte die Art der Beobachtung (Hellfeld, Phasenkontrast, Fluorescenz) schnell gewechselt werden, ohne das Objekt dabei verschieben zu müssen. Beim Übergang von Fluorescenz- zu Hellfeld- oder Phako-Betrachtung brauchte nur die Kupfersulfatküvette und das Erregerfilter gegen einige Milchglasscheiben und ein Tageslichtfilter ausgetauscht

zu werden. Alle wichtigen fluorescenzmikroskopischen Ergebnisse wurden mit dem etwas lichtstärkeren Fluorescenzmikroskop von Leitz nachgeprüft.

Für die kapillaranalytischen, elektrophoretischen und papierchromatographischen Versuche benutzte ich das Filterpapier 2043b von Schleicher & Schüll. Es zeigt im auffallenden UV-Licht eine schwache violette Eigenfluorescenz. Die Papierchromatogramme ließ ich mit einem Gemisch von 4 Teilen Aceton (Merck, p. a.) und 6 Teilen Wasser aufsteigend laufen; die Laufstrecken betrugen ungefähr 24 cm. Im übrigen sei auf CRAMER (1953) verwiesen.

3. Versuche mit Nilblau und Nilrot.

Das 18—22 Std alte submerse Mycel von *Mucor racemosus* zeigt im mikroskopischen Bild zahlreiche gut entwickelte Hyphen. Die Mehrzahl der Hyphen hat nur wenige Querwände, daneben sind aber auch einige mit stärkerer Septierung vorhanden. Im Extremfall entstehen durch reichliche Querwandbildungen Kugelzellen, die meist im Verband bleiben, gelegentlich aber auch unter Abrundung und Volumenvergrößerung zerfallen. Die Kugelzellen sind nach WEHMER (1907) keine normalen Bildungen von *Mucor racemosus*; in größerer Menge werden sie nur unter ungünstigen Verhältnissen (z. B. bei beginnendem Sauerstoffmangel) gebildet. Mein Versuchsmaterial enthielt i. a. nur wenige Kugelzellen. Die Kugelzellen einschließlich der häufiger septierten Hyphen und kurzen Hyphenstücke besitzen eine größere Widerstandskraft gegenüber schädigenden Einflüssen als die normalen Hyphen, sie sterben z. B. bei Überfärbung zu einem geringeren Prozentsatz als diese ab. Sonst lieferten aber die Kugelzellen praktisch die gleichen Versuchsergebnisse wie das normale Mycel, so daß es i. a. nicht nötig ist, zwischen Kugelzellen und normalen Hyphen zu unterscheiden. Die Hyphen haben einen Durchmesser von 7—11 μ, die Kugelzellen einen von 8—19 μ.

Das submerse *Mucor*-Mycel weist keine Eigenfluorescenz auf. Nur Gemmen des Luftmycels zeigen manchmal eine grünliche Membranfluorescenz.

Die Versuche wurden zunächst nur mit Nilblausulfat von Grübler, Berlin-West, durchgeführt. Der Farbstoff kam in frisch angesetzten Lösungen 1:10000 in Leitungswasser zur Anwendung ($p_H \sim 7{,}2$). Die Färbezeit betrug 2 min.

Das gefärbte Mycel enthält einige tote, intensiv blau gefärbte Hyphen. Die lebenden Hyphen speichern das Nilblau vorwiegend diffus oder in Form von Tröpfchen in den Vacuolen (Abb. 1), aber auch eine schwache Plasmafärbung kann gelegentlich beobachtet werden. Ferner tritt vereinzelt Membranfärbung auf. Charakteristisch ist, daß stets etwa nur die Hälfte der lebenden Hyphen eine Färbung zeigt; längere Färbezeiten ändern daran nichts.

Wird das 2 min vitalgefärbte Mycel einer fl.mikrosk. Analyse im Blaulicht unterzogen, so ist in den Hyphen eine Granulafluorescenz (GF)

zu beobachten. Es treten zwei grundverschiedene, sich überdeckende Typen der GF auf. Sofort nach der Auflegung des Deckglases ist in allen Hyphen eine relativ schwache GF vorhanden. *Nach wenigen Sekunden nimmt die GF in dicht liegenden Hyphen bedeutend an Intensität zu.* Auch im weniger dicht liegenden Mycel beginnen die Granula bald intensiver zu fluorescieren, so daß nach etwa 15 min in fast allen Hyphen eine intensive GF zu sehen ist. Saugt man durch die Präparate 1%iges H_2O_2 oder mit O_2 angereichertes Leitungswasser, so blaßt die intensive GF rasch ab, eine schwache GF bleibt aber erhalten. Doch bald tritt erneut eine intensive GF auf, die wieder durch H_2O_2 abgeschwächt werden kann, usf. *Die intensive GF kann nur bei Sauerstoffmangel und nur in lebenden, nicht aber in toten Hyphen beobachtet werden.*

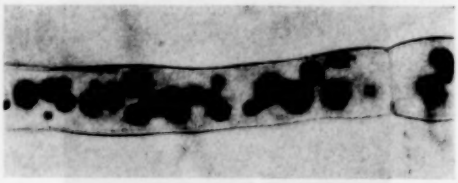


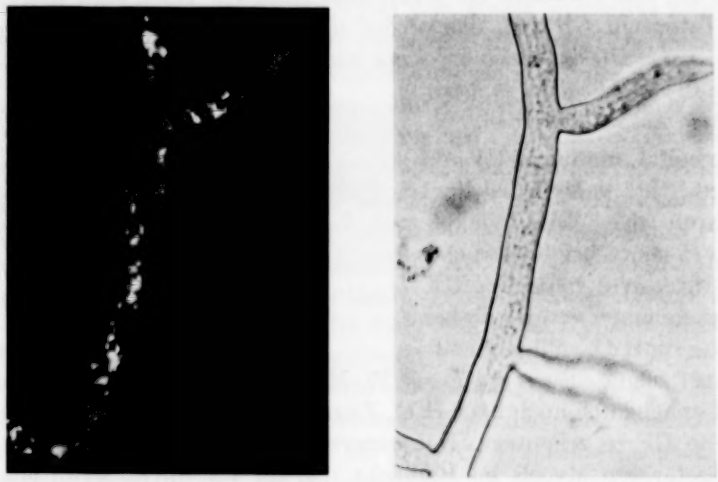
Abb. 1. Vacuolenfärbung in einer Hyphe von *Mucor racemosus* mit Nilblau.

Arbeitet man mit UV als Erregerlicht, so kann bei Verwendung des Zeiss-Winkel-Statives nur bei O_2-Mangel eine intensive goldgelbe GF wahrgenommen werden, die bei Zugabe von H_2O_2 völlig erlischt. Benutzt man dagegen das große Fl.-Mikr. von Leitz, so ist in einem Teil der Hyphen auch noch nach H_2O_2-Zugabe im UV eine schwache gelblich-rötliche GF zu erkennen. Das unterschiedliche Verhalten des mit Nilblau gefärbten Mycels im Blaulicht und im UV dürfte wohl in erster Linie dadurch bedingt sein, daß — vor allem bei Verwendung des Zeiss-Winkel-Statives — die Intensität des Erregerlichtes bei Benutzung des BG 12-Filters viel größer ist als bei Benutzung des UG 1-Filters. Aber auch die verschiedene Lichtqualität kann von Einfluß sein. Bei der Verwendung des Zeiss-Winkel-Statives als Fl.-Mikr. ergab sich daraus der praktische Vorteil, leicht zwischen der durch O_2 nicht beeinflußten schwachen und der an Sauerstoffmangel gebundenen intensiven GF unterscheiden zu können: Eine im UV auftretende GF war stets an O_2-Mangel gebunden, während im Blaulicht beide Typen der GF zu beobachten waren.

Die fluorochromierten Hyphen enthalten sehr viele kleine, im UV bei Luftabschluß intensiv goldgelb fl.ende Granula. Im Hellfeld sind die Granula mit der Ölimmersion (100/1,30) gerade noch wahrnehmbar, sie besitzen ein lipoidartiges Aussehen. Häufig nehmen die Granula in den Nilblaupräparaten etwas an Größe zu. Eine genauere Charakterisierung dieser cytoplasmatischen Einschlüsse erfolgt auf S. 499 ff. Abb. 2a gibt eine im Blaulicht aufgenommene Hyphe mit GF wieder, Abb. 2b zeigt dieselbe Hyphe im Hellfeld. Leider war es nicht möglich, die GF mit der Ölimmersion aufzunehmen, so daß in der hier wiedergegebenen

Abbildung die Kleinheit der Granula nicht zum Ausdruck kommt, sondern mehrere zusammen als mehr oder weniger große leuchtende Flecke erscheinen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß reduzierte Nilblaulösungen intensiv fluorescieren (DRAWERT 1952) und daß Pilze zur Reduktion des Farbstoffes befähigt sind (GUILLIERMOND u. GAUTHERET 1940/46). Da die intensive GF nur in lebenden Hyphen und nur bei Sauerstoffmangel (Deckglasauflegung!) auftritt, muß sie auf einer Reduktion des Nilblaus



a b

Abb. 2a u. b. a Hyphe von *Mucor racemosus* mit Granulafluorescenz, die durch reduziertes Nilblau hervorgerufen wird (Filter: BG 12 + OG 5). b Dieselbe Hyphe im Hellfeld.

beruhen. *Durch die Lebenstätigkeit des Pilzes wird der Farbstoff reduziert, und die stark fl.ende reduzierte Form ruft die intensive Granulafluorescenz hervor.*

Da außer der intensiven O_2-Mangel-GF Nilblau aber noch eine schwächere GF bedingt, die von der O_2-Spannung unabhängig ist, wurde papierchromatographisch geprüft, ob sich in der Handelsware „Nilblausulfat" mehrere Farbstoffkomponenten nachweisen lassen. Die Chromatogramme ließ ich mit der bereits unter „Methodik" erwähnten Aceton-Wasser-Mischung laufen, die sich von mehreren ausprobierten Lösungsmitteln als am geeignetsten erwiesen hatte. *Nilblausulfat wird chromatographisch in zwei Substanzen zerlegt:* in eine im Tageslicht blaue Komponente mit $R_f = 0{,}36 \pm 0{,}02$ und in eine nur im UV-Licht sichtbare rot fl.ende Komponente mit $R_f = 0{,}60 \pm 0{,}02$. Die blaue Komponente soll Nilblau R genannt werden (vgl. S. 490). Im UV fl.iert der Nilblau R-Fleck ganz schwach rot. Die rot fl.ende Komponente ist im Nilblau nur in sehr geringer Menge enthalten. Für ihren Nachweis ist es

erforderlich, am Start der Chromatogramme reichlich Nilblaulösung aufzutragen. Am besten gelingt das durch Auftragen der Lösung in mehreren Portionen nacheinander.

Die Vermutung lag nahe, daß die rot fl.ende Komponente mit Nilrot[1] identisch ist, da dieses nach den Angaben in der Literatur immer im Nilblau enthalten sein soll. Läßt man im Pap.-Chrom. parallel zum Nilblau Nilrot mitlaufen, das in Benzol gelöst aufgetragen wurde, so ergibt das Nilrot einen rötlichen Fleck, der im UV-Licht intensiv rot fl.iert und der den gleichen R_f-Wert wie die rot fl.ende Komponente aus der Nilblaulösung besitzt. Bei der rot fl.enden Komponente des Nilblaus dürfte es sich also um Nilrot handeln.

Nilrot ist in organischen Lösungsmitteln gut löslich, die Lösungen zeigen eine intensive Fluorescenz (vgl. Tabelle 1, S. 492). In kaltem Wasser ist es nicht löslich. Kocht man aber etwas fein zerriebene Substanz mit Wasser, gehen Spuren in Lösung und das Wasser wird schwach blau. Ich kochte 30 min gelinde, filtrierte heiß vom ungelösten Rückstand ab (die Filter wurden dabei schwach blau) und ließ dann erkalten. Die so gewonnene Nilrotlösung ist praktisch farblos. Legt man in diese Lösung *Mucor*-Mycel ein und untersucht es nach einigen Minuten im Blaulicht, dann *fluorescieren in allen Hyphen (lebenden und toten) die Granula*. Die GF ist ziemlich intensiv und *von der O_2-Spannung völlig unabhängig*. Im UV fl.en die Granula gelblich bis gelblich-rötlich, die Intensität ist hier bedeutend geringer als im Blaulicht. Die Hyphen erscheinen im Hellfeld ungefärbt.

Mit Nilrot ist im ganzen geprüften pH-Bereich von pH 2,2—10,8 eine GF zu erzielen. Bei pH 7,8 und 9,9 fl.en die Granula in den lebenden Hyphen etwas intensiver als im stärker sauren oder alkalischen Bereich. Die Fl. erreicht aber nicht die Intensität der durch Nilblau bei O_2-Mangel hervorgerufenen GF.

Da mit Nilrot sowohl in lebenden als auch in toten Hyphen eine GF auftritt, untersuchte ich noch Mycel, das 12 Std mit Formol (10%ig) fixiert worden war. Das Material besitzt keine Eigenfluorescenz. Wird das Mycel in Nilrotlösung eingelegt und nach 10 min mikroskopisch untersucht, dann sind im Hellfeld in den Hyphen kleine ungefärbte Lipoidtröpfchen zu sehen, die im Blaulicht fl.en.

Es war noch von Interesse, das Wachstum von *Mucor racemosus* in Nährlösung mit Zusatz von Nilrot zu verfolgen. Der Pilz entwickelt sich fast normal. Alle Entwicklungsstadien des submersen und des nach 1—2 Tagen gebildeten Luft-Mycels zeigen eine Granulafluorescenz, nur die Sporen sind fl.frei. Im Vergleich mit ungefärbten Kontrollen ist

[1] Dem Direktor des Organisch-chemischen Institutes der Freien Universität Berlin, Herrn Prof. Dr. LAUTSCH, bin ich für die Überlassung eines Nilrotpräparates (7-Diäthylamino-3, 4-benzophenoxazon-2) zu besonderem Dank verpflichtet.

das Wachstum etwas langsamer und die Sporangienbildung ist schwach gehemmt.

Es war nun zu prüfen, welche fl.mikrosk. Ergebnisse eine Nilblaulösung liefert, die von Nilrot befreit wurde. Nilrotfreies Nilblau soll mit Nilblau R bezeichnet werden. In Anlehnung an LISON (1935) wurde eine 2%ige Nilblaulösung in dest. H_2O 11mal mit Toluol ausgeschüttelt, nach jeder Ausschüttelung wurde das Toluol abgetrennt und durch neues ersetzt. Anfangs färbte sich das Toluol kräftig rot, es fl.ierte im UV-Licht rötlichviolett. Die Färbung ließ aber bald nach, von der 9. Ausschüttelung an war das Toluol nur noch schwach gelbbraun gefärbt und fl.ierte nicht mehr. Chromatographisch konnte im Toluol der 1. Ausschüttelung viel Nilrot und eine Spur Nilblau R, in dem der 11. Ausschüttelung nur etwas Nilblau R nachgewiesen werden. Die wäßrige Phase enthielt also kein Nilrot mehr, sondern nur noch Nilblau R. Wichtig ist auch, daß das Toluol der 11. Ausschüttelung, in dem nur etwas Nilblau R (Farbbase) enthalten ist, nicht fluoresciert.

Die vom Nilrot befreite 2%ige Nilblaulösung wurde sofort mit Leitungswasser auf etwa 1:10000 verdünnt und zur Vitalfärbung benutzt. In dem 2 min mit dieser Lösung behandelten *Mucor*-Mycel tritt im Blaulicht *nur bei O_2-Mangel und nur in lebenden Hyphen eine GF auf*, die durch H_2O_2 restlos zur Löschung gebracht werden kann. *Allium*-Oberepidermen liefern das gleiche Ergebnis. Im Hellfeld sind die üblichen Färbungen vorhanden. Die völlige Fl.-Löschung durch H_2O_2 ist auch im großen Fl.-Mikr. von Leitz zu beobachten. — Die chromatogr. Analyse bestätigte, daß die benutzte Farblösung nur Nilblau R und kein Nilrot enthielt.

Damit sind die zwei Typen der GF, die in den mit Nilblau gefärbten *Mucor*-Hyphen auftreten, kausal erklärt. Die relativ schwache, von der O_2-Spannung unabhängige GF wird durch das Nilrot hervorgerufen, das stets in Nilblaulösungen vorhanden ist und das auch für sich allein zu einer von der Sauerstoffversorgung unabhängigen Fluorochromierung der Granula verwendet werden kann. Die nur bei O_2-Mangel und nur in lebenden Hyphen auftretende intensive goldgelbe GF wird durch reduziertes Nilblau R bedingt. Bei guter O_2-Versorgung erhält man mit nilrotfreiem Nilblau keine GF.

Eine Nilblaulösung 1:1000 oder 1:10000 in Leitungswasser, die längere Zeit gestanden hat, besitzt andere Eigenschaften als eine frisch bereitete Farblösung. Während *Mucor*-Mycel, das mit einer frischen Lösung gefärbt wurde, bei guter O_2-Versorgung im UV (Zeiss-Winkel-Stativ) keine Fluorescenz aufweist, *zeigen Hyphen, die mit einer alten Farblösung behandelt wurden, auch bei guter O_2-Versorgung im UV eine grünlich-gelbliche GF* mittlerer Intensität. Bei O_2-Mangel wird auch hier die Granulafluorescenz bald intensiver und der Farbton ändert sich

nach goldgelb. Die intensive GF kann durch H_2O_2 abgeschwächt werden, eine schwächere grünlich-gelbliche GF bleibt erhalten. Offensichtlich bilden sich in den Nilblaulösungen Zersetzungsprodukte, die entweder selbst eine von der O_2-Spannung unabhängige GF hervorrufen oder die eine Verstärkung der sonst im UV nicht sichtbaren Nilrot-GF bewirken.

Mit verschiedenen Mitteln wurde versucht, die Zersetzung der Farblösung künstlich herbeizuführen. Durch 15 min langes gelindes Kochen gelang eine völlige „Zersetzung" von 0,1 oder 0,01%igen Nilblaulösungen in Leitungswasser. Beim Kochen entstand ein blauroter Niederschlag. Die erkaltete Lösung wurde filtriert. Das Filtrat soll als Z-Lösung (zersetzte Lösung) bezeichnet werden. Die fast farblosen Z-Lösungen zeigen schwach gelbbraune, aber auch bläuliche, olivgrüne oder rötliche Farbtöne. Im UV-Licht fl.en sie schwach grünlich-gelb.

Wird *Mucor*-Mycel in Z-Lösung eingelegt und darin fl mikrosk. untersucht, so ist im Blaulicht und im UV in allen Hyphen (lebenden und toten) eine intensive GF vorhanden, die von der O_2-Spannung völlig unabhängig ist. Der Farbton der Fl. im UV ist nicht in allen Hyphen gleich; in einigen Hyphen fl.en die Granula grünlich, in anderen gelblich, in noch anderen rötlich. Die Präparate sind etwas diffus überstrahlt. Im Hellfeld ist keine Färbung zu erkennen.

In der Z-Lösung können papierchromatographisch drei Substanzen nachgewiesen werden. Sie sind nur im UV-Licht zu erkennen und zeigen folgende Fl.-Töne: 1. eine rote Komponente, die mit Nilrot identisch ist ($R_f = 0{,}60$), 2. eine gelbe Komponente mit $R_f \sim 0{,}88$ und 3. eine grüne Komponente mit $R_f \sim 0{,}94$. Nilblau R enthält die Z-Lösung nicht mehr. Die genannten Substanzen sind in der Z-Lösung nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Damit sie im Chromatogramm zu erkennen sind, ist es erforderlich, am Start reichlich Z-Lösung aufzutragen.

Die beschriebenen Zersetzungserscheinungen treten nur dann auf, wenn das Nilblau in Leitungswasser (LW), nicht aber wenn es in destill. Wasser gelöst ist. Für Vitalfärbungsversuche wird aber LW bevorzugt als Lösungsmittel benutzt, da es durch seinen ausbalancierten Ionengehalt weniger schädlich wirkt als reines dest. Wasser. Die in den Versuchen verwendeten Nilblaulösungen 1:10000 in LW wurden immer durch Verdünnen aus einer Stammlösung 1:1000 in glasdestilliertem Wasser hergestellt. Solche Stammlösungen sind, wenn sie kühl und dunkel aufbewahrt werden, monatelang haltbar, ohne daß die geringsten Veränderungen festzustellen sind.

Nilblau-, Nilblau R-, Nilrot- und Z-Lösungen wurden mit Benzol bzw. Toluol und mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach der Trennung der Phasen waren in den organischen Lösungsmitteln die in Tabelle 1 aufgeführten Farb- und Fl.-Erscheinungen zu beobachten; zum Vergleich wird das in Benzol bzw. Chloroform direkt gelöste Nilrot mit

Tabelle 1. *Ergebnis der Ausschüttelungsversuche mit hydrophoben Medien. Von den angeführten Farbtönen kamen geringe Abweichungen vor.*

	Benzol oder Toluol		Chloroform	
	Tageslicht	UV	Tageslicht	UV
Frische Nilblau R-Lösung (1:10000 in Leitungswasser)	gelborange	ohne Fl.	—	—
Frische Nilblaulösung (1:10000 in Leitungswasser)	gelborange	eosinrot	rotorange	orange
Alte Nilblaulösung (1:10000 in Leitungswasser)	gelborange	intensiv ockergelb	rotorange	intensiv gelborange
Z-Lösung	schwach rötlich	intensiv hellgrün (etwas milchig)	schwach rötlich	intensiv hellgelb (etwas milchig)
Nilrotlösung	schwach rot	schwach gelblich	schwach violettrot	schwach rötlich
In Benzol bzw. Chloroform direkt gelöstes Nilrot	rot	intensiv gelbbraun	violettrot	intensiv rötlich

angegeben. In diesen Ausschüttelungsversuchen ging das Nilblau als Farbbase praktisch quantitativ in die organischen Phasen über.

Ausschüttelungsversuche mit Benzol zur Prüfung der Lipoidlöslichkeit in Abhängigkeit von der cH der wässerigen Phase ergaben, daß im ganzen geprüften pH-Bereich (pH 2,2—10,8) der Verteilungskoeffizient des Nilrotes zugunsten der hydrophoben Phase liegt. Beim Nilblau konnten die Angaben von DRAWERT (1940, 1952) über die Zunahme der Lipoidlöslichkeit mit fallender cH bestätigt werden. Die Lipoidlöslichkeit von reduziertem Nilblau nimmt ebenfalls mit fallender cH zu, die reduzierte Form des Farbstoffes besitzt jedoch eine bedeutend bessere Lipoidlöslichkeit als die oxydierte Form. *Aus den Modellversuchen kann geschlossen werden, daß die mit Nilrot und reduziertem Nilblau fluorochromierbaren Zellstrukturen — die Granula — reich an Lipoiden sind.*

Werden Nilrot- und Z-Lösungen mit verd. KOH versetzt, dann fällt nach einiger Zeit eine geringe Menge eines voluminösen schmutzigweißen Niederschlages aus. Der Niederschlag in der Z-Lösung wird nach längerem Stehen grünlich.

Alle bisher mitgeteilten Versuchsergebnisse beziehen sich auf „Nilblausulfat" von Grübler, Berlin-West. Es war nun von Interesse zu prüfen, ob auch andere Nilblaufabrikate die gleichen Ergebnisse liefern.

Einschließlich des bisher benutzten Nilblausulfates (1) untersuchte ich die in Tabelle 2 aufgeführten acht Nilblaupräparate:

Tabelle 2. *Die untersuchten Nilblaupräparate und ihre Herkunft.*

1. Nilblausulfat (Grübler, Berlin-West)
2. Nilblausulfat A (Grübler, Stuttgart-Untertürkheim)
3. Nilblauchlorhydrat (Grübler, Stuttgart-Untertürkheim)
4. Nilblau (Grübler, Leipzig; Vorkriegsware)
5. Nilblau (Grübler, Stuttgart-Untertürkheim)
6. Nilblau (Merck)
7. Nilblau stand. (Bayer)
8. Nilblau A stand. (Bayer)

Die Nummern aus Tabelle 2 werden im folgenden jeweils in Klammern hinter den Namen der Fabrikate angegeben.

Alle angeführten Farbstoffe sind miteinander identisch. Sie liefern dieselben Ergebnisse, wie sie für Nilblausulfat (1) beschrieben worden sind. Auf einem Filtrierpapierbogen nebeneinander chromatographiert, zeigt jeder Farbstoff nur eine blaue (Nilblau R) und eine rot fl.ende Komponente (Nilrot); die blauen bzw. rot fl.enden Komponenten haben gleiche R_f-Werte.

Alle Nilblaufabrikate prüfte ich mit $BaCl_2$ und verdünnter HCl auf SO_4^{--} und mit $AgNO_3$ und verd. HNO_3 auf Cl^-. Der Sulfatnachweis fiel bei allen Fabrikaten negativ aus. Chlorid ließ sich in allen Farbstoffen nur in Spuren nachweisen; bei keinem Farbstoff war die Reaktion so positiv, daß die Annahme von Cl^- als Farbstoffanion berechtigt wäre. In Tabelle 3 sind die von Herrn Dipl. Chem. GNICHTEL[1] vom Institut für organische Chemie der Freien Universität Berlin bei einer Nachprüfung erhaltenen Ergebnisse wiedergegeben.

Tabelle 3. *Ergebnis der Prüfung von vier Nilblaupräparaten auf Schwefel und Chlor*

Farbstoff	Schwefel	Chlor
Nilblausulfat (1) . . .	Spur?	etwas nachweisbar
Nilblausulfat A (2) . .	ganz schwach nachweisbar	relativ viel nachweisbar
Nilblauchlorhydrat (3)	nicht nachweisbar	nachweisbar
Nilblau stand. (7) . .	etwas nachweisbar	relativ viel nachweisbar

Aus den Analysen geht eindeutig hervor, daß keines der geprüften Fabrikate ein Sulfat sein kann, auch nicht die als „Sulfate" ausgegebenen Farbstoffe (1 u. 2); sie enthalten nur Spuren von Schwefel. Wahrscheinlich sind die Farbstoffe auch keine Chloride; das hier hauptsächlich benutzte Nilblau„sulfat" (1) ist bestimmt kein Chlorid. Daß Spuren von Schwefel und Chlor nachzuweisen sind ist verständlich, da es sich bei den Farbstoffen um technische Produkte handelt.

Nilblau„sulfat" (1) prüfte ich noch auf Acetat. Wird gesättigte Nilblau„sulfat"-Lösung mit $AgNO_3$ versetzt, entsteht eine größere Menge eines kristallinen Niederschlages, der Perlmutterglanz besitzt. Da ein Niederschlag dieser Art spezifisch sein soll (vgl. J. SCHMIDT 1932, S. 383), liegt vermutlich ein Acetat vor.

Versuche, Nilblau nach der Vorschrift von THORPE quantitativ in Nilrot überzuführen, gelangen nicht. Nur ein geringer Teil des Nilblaus wandelte sich in Nilrot um.

[1] Auch an dieser Stelle möchte ich Herrn Dipl.-Chem. GNICHTEL für sein Entgegenkommen danken.

Da alle geprüften Nilblaufabrikate (1—8) die gleichen Eigenschaften besitzen, war es nicht notwendig, für die Versuche mehrere Fabrikate heranzuziehen. Ich benutzte nur Nilblau„sulfat" (1), das kurz als Nilblau bezeichnet werden soll.

In Vitalfärbungsversuchen mit Nilblaulösungen verschiedener cH fällt auf, daß die O_2-Mangel-GF nach Deckglasauflegung um so schneller in Erscheinung tritt, je geringer die H-Ionenkonzentration des Außenmediums ist. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben von GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1938c, 1940/46) und BUCHY (1941) überein, daß der Farbstoff bei alkalischer Reaktion schneller als bei saurer reduziert wird. Zur Erklärung dieser Erscheinung muß man berücksichtigen, daß das Nilblau zwei Eigenschaften besitzt, die sich mit der cH ändern: Erstens wird das Redoxpotential mit fallender cH negativer (COHEN u. PREISLER); eine Eigenschaft, die im Normalfall allen Redoxsystemen zukommt. Zweitens nimmt die Lipoidlöslichkeit mit fallender cH zu.

Die Reduktion eines Farbstoffes kann auf zwei Wegen geschehen. Erstens: der Farbstoff ist permeierfähig und wird in den Hyphen von zelleigenen Dehydrasen reduziert. Zweitens: die Zelle ist für den Farbstoff impermeabel, und er wird entweder an der äußeren Oberfläche des Protoplasten oder im Außenmedium durch Stoffe, die der Pilz abgibt, reduziert.

Die Reduktion von permeierfähigen Redoxindikatoren in der Zelle ist bei entsprechender Lage des Red.-Pot. auf jeden Fall möglich. Dagegen dürfte eine extracelluläre Reduktion nur in einigen Sonderfällen in Betracht zu ziehen sein. Da das Nilblau permeiert, ist die Annahme berechtigt, daß es in den benutzten kurzen Versuchszeiten (20 min) praktisch nur intracellulär reduziert wird. Bei einer intracellulären Reduktion kann die cH des Außenmediums keinen wesentlichen Einfluß auf das Nilblau-Red.-Pot. im Zellinnern und damit auf die Reduktionsgeschwindigkeit haben. Bei den benutzten Phosphatpuffern dürfte in den angewendeten Versuchszeiten sich kaum ein Einfluß der Außen-cH auf die cH der verschiedenen Phasen im Zellinnern bemerkbar machen. Dagegen müssen die Faktoren einen großen Einfluß haben, die mit der Aufnahme des Nilblaus in Zusammenhang stehen, wie der Dissoziationsgrad und die Lipoidlöslichkeit (vgl. DRAWERT 1940, 1948, 1951).

Entsprechend den Angaben in der Literatur wird Nilblau im sauren Bereich nicht in den lebenden Hyphen gespeichert. Von pH 3,5—6,1 ist im Hellfeld nur Membranfärbung zu beobachten. Ab pH 6,4 tritt Vacuolen-, bei stärkerer alkalischer Reaktion auch Plasmafärbung auf. Je nach dem pH-Wert des Außenmediums sind die Bedingungen der Nilblaureduktion verschieden. Bei pH < 6,4 steht dem Pilz kein intracellulär gespeicherter Farbstoff zur Verfügung, es tritt nur dann eine intensive O_2-Mangel-GF auf, wenn das Mycel in der Farblösung liegenbleibt und darin beobachtet wird. Bei pH > 6,4 dagegen verfügt der Pilz über genügend intracellulär gespeichertes Nilblau und das Auftreten der O_2-Mangel-GF wird nicht wesentlich davon beeinflußt, ob die Hyphen in Farblösung liegen oder ob 2 min gefärbtes Mycel verwendet wird.

Wenn der Pilz eine genügend große Reduktionskapazität besitzt und wenn ihm genügend Nilblau zur Reduktion zur Verfügung steht, hängt die Reduktionsgeschwindigkeit von der Reduktionsintensität ab. Für unsere Betrachtung kann die Reduktionsintensität gleich der Atmungsintensität gesetzt werden. Je intensiver der Pilz atmet, desto eher wird der für die Reduktion des Nilblaus notwendige O_2-Mangel im Präparat vorhanden sein; bei O_2-Mangel dient dann das Nilblau an Stelle des Sauerstoffes als Acceptor für den bei der Dissimilation frei werdenden Wasserstoff. Der Farbstoff selbst beeinflußt aber auch die Reduktionsintensität. Nach BARRON u. HOFFMAN (1930) und BRIN u. KRASNOVSKIJ (1951) wird die Atmung durch Redoxindikatoren (Nilblau u. a.) erhöht. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache kann die Abhängigkeit der Reduktionsgeschwindigkeit von der cH des Außenmediums wohl teilweise aus den Speicherungsverhältnissen (vgl. dazu

DRAWERT 1940, 1948, 1951; HÖFLER 1947) erklärt werden: Mit abnehmender cH nimmt erstens die Zahl der permeierfähigen Farbbasenmoleküle im Außenmedium zu, wodurch ein schnelleres Eindringen des Farbstoffes in die Hyphen ermöglicht wird; zweitens bedingt die Farbstoffspeicherung eine Erhöhung der Atmungsintensität. Die beobachtete Zunahme der Reduktionsgeschwindigkeit dürfte sich im wesentlichen aus diesen beiden Momenten erklären lassen. Für eine genaue Analyse der Reduktionsgeschwindigkeit wären jedoch quantitative Messungen nötig. Es müßten unter anderem noch der Einfluß der cH auf die Atmung und die Abhängigkeit des Nilblau-Redoxpotentials von der Farbstoffkonzentration (COHEN u. PREISLER) berücksichtigt werden.

4. Versuche an einigen anderen Objekten mit Nilblau und Nilrot.

Es war noch zu prüfen, ob die am submersen Mycel von *Mucor* erhaltenen Ergebnisse an anderen Objekten bestätigt werden können. Dazu wurden einige Versuche mit *Mucor*-Luftmycel, mit Hyphen von *Basidiobolus ranarum* und *Penicillium chrysogenum* sowie mit Bäckerhefe und den Oberepidermen von Zwiebelschuppenblättern durchgeführt. Die genannten Objekte ergaben mit Nilblau und Nilrot grundsätzlich die gleichen Ergebnisse wie das submerse *Mucor*-Mycel. In einer bestimmten Zellsorte werden durch Nilrot und reduziertes Nilblau stets dieselben lipoiden Strukturen fluorochromiert.

Dagegen sind die in den verschiedenen Objekten fluorescierenden Zelleinschlüsse nicht miteinander identisch. In den Pilzzellen werden die „Granula", in den Gemmen des *Mucor*-Luftmycels die Öltropfen und in den Zwiebelepidermiszellen die Sphärosomen fluorochromiert. Aber auch bei den „Granula" der verschiedenen Pilze bzw. der verschiedenen Entwicklungsstadien von *Mucor* ist es fraglich, ob sie einander homolog sind oder ob es sich nur um äußerlich ähnliche Gebilde handelt.

5. Rückblick auf die Versuche mit Nilblau und Nilrot.

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse können wir jetzt die Fluorochromierung der Sphärosomen bzw. der Granula mit Nilblau einer kausalen Erklärung zuführen. Mit Nilblau läßt sich eine von der Sauerstoffspannung unabhängige und eine davon abhängige Fluorescenz der Granula erzielen. Der erste Typ kann u. U. von dem zweiten überdeckt werden. Der erste Typ wird nicht, wie DRAWERT zunächst vermutete, durch die Farbbase des Nilblaus verursacht, sondern durch das in dem Nilblau des Handels immer vorhandene, stark lipoidlösliche und fl.ende Nilrot. Der zweite Typ der GF wird dagegen durch die lipoidlösliche und, wie wir seit den Untersuchungen von DRAWERT wissen, auch fluoreszierende reduzierte Form des Nilblaus hervorgerufen. Diese GF kann also nur bei O_2-Mangel auftreten und nur dann, wenn das untersuchte Objekt in der Lage ist, den Farbstoff zu reduzieren. Sowohl das Nilrot als auch die reduzierte Stufe des Nilblaus werden sehr wahrscheinlich

auf Grund ihrer guten Lipoidlöslichkeit von den lipoidreichen Granula bzw. Sphärosomen gespeichert und bedingen so deren elektive Fluorescenz.

Das seit langem in der Histologie als Fettfarbstoff bekannte Nilrot hat sich als ein wertvoller neuer Fluorescenzfarbstoff erwiesen. Die durch Kochen gewonnene wässerige Nilrotlösung ist hervorragend zur Fluorochromierung von lipoidreichen Strukturen in toten und vor allem auch in lebenden Zellen geeignet, da es die für einen Vitalfarbstoff wichtige Eigenschaft besitzt, fast völlig unschädlich zu sein.

Die fl.mikrosk. Analyse des Nilblau R hat es ermöglicht, den Speicherungsort des reduzierten Farbstoffes in der lebenden Zelle festzustellen. Durch die Reduktion erhöht sich die Lipophilie des Nilblau R: die oxydierte Form wird in der wässerigen Phase des Zellsaftes, die fl.ende reduzierte Form dagegen in den an Lipoiden reichen Zellstrukturen gespeichert. Die Annahme von GUILLIERMOND und GAUTHERET (1940/46), daß die Leukoform genau so wie das Nilblau in den Vacuolen angehäuft wird, dürfte danach nicht zutreffend sein.

Die intensive Fl. des reduzierten Nilblau R gestattet es, bereits die Reduktion von geringen Mengen des Farbstoffes zu erkennen. So ist die Reduktion des Nilblaus durch die Oberepidermen der Zwiebelschuppen nur fl.mikrosk. nachweisbar. Bei O_2-Mangel tritt zwar eine intensive Sphärosomen-Fl. auf, die Zwiebelzellen sind aber nicht wie *Mucor* in der Lage, den Farbstoff bis zur völligen Entfärbung im Hellfeld zu reduzieren. Die Angabe von GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1940/46), daß die Zwiebel im Gegensatz zu den Pilzen das Nilblau nicht reduzieren kann, muß also dahin berichtigt werden, daß die Zwiebel nur zur Reduktion von geringen Mengen des Farbstoffes befähigt ist.

6. Die morphologische Analyse der lebenden *Mucor*-Hyphe. Vergleichende Untersuchungen mit Janusgrün B, TTC, dem Nadi-Gemisch und Rhodamin B.

Nach der Analyse der Granulafluorochromierung mit Nilblau und Nilrot galt es noch zu klären, zu welcher Kategorie von Cytoplasmaeinschlüssen die Granula gehören. Um darauf eine Antwort zu finden, wurden die Hyphen des submersen *Mucor*-Mycels einer genauen Analyse im normalen und im Phasenkontrastmikroskop unterzogen und zum Vergleich mit Janusgrün B, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), Indophenolblau (Nadi-Reaktion) und Rhodamin B gefärbt.

Die Cytoplasmaeinschlüsse werden heute von biochemischer Seite als Sitz vieler Fermente angesehen (vgl. CHESSIN 1951, LANG 1952, PERNER 1953, LINDBERG u. ERNSTER 1954). In diesem Zusammenhang verdienen die Arbeiten mit TTC und dem Nadi-Gemisch ein besonderes Interesse, da ein Teil der Autoren die Speicherorte des gebildeten Formazans bzw.

Indophenolblaus als Reduktions- bzw. Oxydationsorte in der lebenden Zelle anspricht.

Seit MICHAELIS (1900) wird Janusgrün häufig zur Darstellung von Zellgranula verwendet. Die durch Janusgrün B gefärbten Strukturen werden i. a. als Mitochondrien angesprochen. Einige Autoren (z. B. RITCHIE u. HAZELTINE, 1953) weisen aber darauf hin, daß der Farbstoff von Partikeln gespeichert wird, die einander nicht homolog sind. Vom Janusgrün B gibt es mehrere Reduktionsstufen (LAZAROW u. COOPERSTEIN 1953), unter anderem wird es irreversibel unter Sprengung der Azobindung zu Safranin (rot) reduziert; das Safranin kann dann weiter reversibel zum farblosen Leukosafranin reduziert werden. Über die Vitalfärbung mit Janusgrün und über die Giftigkeit des Farbstoffes machen GUILLIERMOND (1930, 1940, 1941) und GUILLIERMOND u. GAUTHERET (1940/46) umfangreiche Angaben. Janusgrün B färbt vorwiegend die Mitochondrien, die dabei oft pathologische Veränderungen zeigen, aber auch Vacuolen-, Plasma- und Kernfärbungen kommen vor. Der Farbstoff wird von lebenden Zellen leicht bis zur roten Stufe reduziert, die Plasma, Kern und Vacuolen färbt. Unter anaeroben Bedingungen wird die rote Stufe von lebenden Organismen auch bis zur Leukoform reduziert. DRAWERT (1953) gelang es fl.mikrosk. nachzuweisen, daß die Leukoform von den Oberepidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa* in den Sphärosomen gespeichert wird. Nach DRAWERT (1953, S. 149) können die im Cytoplasma der Zwiebelzelle vorhandenen Einschlüsse wie folgt unterschieden werden:

„Die Chondriosomen (Mitochondrien + Chondriokonten) sind charakterisiert durch eine Vitalfärbbarkeit bzw. Fluorochromierbarkeit mit Janusgrün B bzw. Berberinsulfat, die aber beide nur bei Sauerstoffgegenwart möglich sind. Bei Sauerstoffmangel erfolgt ein rasches Verblassen der Färbung bzw. Löschung der Fluorescenz.

Für die Mikrosomen ist kennzeichnend ihre elektive Fluorochromierbarkeit sowohl mit Nilblausulfat, die von der Sauerstoffspannung unabhängig ist, wie mit Janusgrün B und Berberinsulfat, die nur bei Sauerstoffmangel in Erscheinung tritt.

Die Leukoplasten lassen sich im lebenden Zustand mit keinem der angeführten Farbstoffe färben oder fluorochromieren."

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) ist ein farbloses, in Wasser lösliches Salz, das von lebenden Zellen leicht zu der rotgefärbten entsprechenden Formazanverbindung reduziert wird. Die Reduktion verläuft irreversibel, das gebildete Formazan ist nur in organischen Lösungsmitteln, nicht aber in Wasser löslich (RIED 1952). Die Speicherorte des Formazans in der lebenden Zelle werden oft als Reduktionsorte angesprochen. Besonders mit Bakterien sind zahlreiche Arbeiten gemacht worden, in denen der Zusammenhang der TTC-Reduktionsorte mit Kern- bzw. Mitochondrienäquivalenten diskutiert wird (Literatur bei RIED und WALLHÄUSZER 1954). Von *Allomyces* geben RITCHIE u. HAZELTINE an, daß sich mit TTC kleine Granula „färben", die niemals sicher als Mitochondrien identifiziert werden konnten; in den Fetttropfen ist die TTC-Reduktion besonders intensiv. Nach BRINGMANN (1953) sind im Mycel von *Penicillium chrysogenum* nach Behandlung mit TTC Formazanausfällungen zu erkennen, die fakultativ an Orten auftreten, welche im Phasenkontrast dunkel sind und die unter anderem durch Janusgrün angefärbt werden; an den Orten der Formazanausfällungen müssen reduzierende Fermente wirksam sein. ZIEGLER (1953) findet, daß das Formazan in Zellen ohne erkennbare Lipoidteilchen zuerst in den Mikrosomen, bei längerer Einwirkung auch in Form von Kristallen im Cytoplasma erscheint, aber auch in Chloroplasten feststellbar ist. Nach ZIEGLER wird das lipophile Formazan sekundär in den lipoiden Teilen der Zelle (z. B. Mikrosomen = Sphärosomen) gespeichert, die nicht als primäre Reduktionsorte angesprochen werden dürfen. Die Sphärosomen (Sph.) der

Zwiebelschuppen-Epidermis speichern sowohl das Formazan als auch das bei der Nadi-Reaktion entstehende Indophenolblau (ZIEGLER).

Aus α-Naphthol + Dimethyl-p-phenylendiamin entsteht in wässeriger Lösung durch Autoxydation Indophenolblau; die Gegenwart von Zellfermenten beschleunigt die Indophenolblau-Synthese, es soll sich dabei um eine spezifische Wirkung der Cytochromoxydase handeln (vgl. PERNER 1952). Das bei dieser sogenannten Nadi-Reaktion entstehende Indophenolblau besitzt wie das Formazan eine hohe Lipoidlöslichkeit, es wird seit HERXHEIMER (1901) in der Histologie als Fettfärbemittel benutzt. Im Gegensatz zur klassischen Gewebs-Nadi-Reaktion (ROMEIS, § 1157ff) vermeidet PERNER (1952) die alkoholische Lösung des α-Naphthols, er löst es in warmem Wasser. Dadurch gelingt ihm eine Indophenolblau-Synthese in lebenden Zellen (Objekt: Zwiebelepidermen). Das Indophenolblau wird in den Sph. gespeichert. Bei langer Einwirkung des Nadi-Gemisches sterben die Zellen ab. Der Autor diskutiert die Frage, ob das Indophenolblau sekundär infolge seiner Lipoidlöslichkeit in den Sph. gespeichert wird oder ob die Sph. als primärer Ort der Indophenolblau-Synthese anzusehen sind. Obwohl ihm an fixiertem Material eine Färbung der Sph. mit Sudan III gelingt, lehnt PERNER eine sekundäre Löslichkeitsspeicherung des Indophenolblaus in den Sph. ab, da diese sich in lebenden Zellen nicht mit Rhodamin B und Pyronin(-Base) fluorochromieren lassen. PERNER (1952, 1953) vertritt daher die Ansicht, daß die Cytochromoxydase in den Sph. der Zwiebel-Epidermiszellen lokalisiert ist. Eine Reihe anderer Autoren (z. B. BAUTZ u. MARQUARDT 1953a, b, sowie BAUTZ 1954) sieht ebenfalls die Orte der Indophenolblauspeicherung als Sitz der Cytochromoxydase an. DRAWERT (1953) führt jedoch die Speicherung des Indophenolblaus in den Sph. (Zwiebel) auf dessen gute Lipoidlöslichkeit zurück. Auch BRENNER (1947) lehnt die Spezifität der Nadi-Reaktion für das Cytochromoxydase-System ab, das Indophenolblau färbt die Fette. ZWEIBAUM (1923a, b) und ZWEIBAUM u. MANGENOT (1923) empfehlen die Nadi-Reaktion zum Nachweis von Fetten.

BAUTZ u. MARQUARDT (1953a, b; 1954) sowie BAUTZ (1954) untersuchen Hefen mit der Nadi-Reaktion. Die sich mit Indophenolblau färbenden „Grana mit Mitochondrienfunktion" sprechen auch auf die Janusgrünfärbung und auf die Färbung nach ALTMANN an. Außerdem färben sich in den Hefezellen mit Janusgrün gelegentlich noch Stäbchen an, die sich mit den beiden anderen Methoden nicht darstellen lassen (BAUTZ 1955a). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis können nach BAUTZ (1955b) in den Hyphen höherer Pilze zwei Sorten von cytoplasmatischen Einschlüssen unterschieden werden: erstens runde Grana, die sich mit den Färbungen nach ALTMANN und nach REGAUD, mit Janusgrün und mit der Nadi-Reaktion darstellen lassen, zweitens mehr oder weniger stäbchenförmige Gebilde, die nur mit der REGAUD-Färbung und mit Janusgrün, nicht aber mit der ALTMANN-Färbung und mit der Nadi-Reaktion dargestellt werden können. Nach STEINER u. HEINEMANN (1954a) sind bei *Oospora lactis* die Nadi-positiven Grana die Orte der primären Fettbildung, was in gewisser Übereinstimmung mit der Angabe von TARWIDOWA (1938) steht, daß die Fetttropfen bei *Basidiobolus ranarum* aus den Chondriosomen entstehen sollen. Bei *Oospora lactis* treten nach STEINER u. HEINEMANN (1954b) zuerst Mitochondrien (I) im klassischen Sinn, dann „Grana mit Mitochondrienfunktion" (II) auf. Wahrscheinlich sind (I) und (II) verschiedene Zustandsformen ein und desselben Zellorganells. „In färberischer Hinsicht ist den unter (I) und (II) genannten Gebilden die Vitalfärbung mit Janusgrün und die Fluorochromierung mit dem gleichen Farbstoff und mit Berberinsulfat gemeinsam. Die Grana (II) und typische Fetttröpfchen zeigen Fluorescenzfärbung mit Nilblausulfat. Die Nadi-Reaktion bereitet bei den Grana (II) keine Schwierigkeiten. Dagegen zerfallen die Mitochondrien (I) nach kurzer Einwirkung des Reagens, noch ehe es zu einer ausgesprochenen Blaufärbung kommt."

Da der Begriff „Grana" jetzt in der Terminologie für die Struktur der Chloroplasten festgelegt ist, sollte man ihn für die Bezeichnung cytoplasmatischer Einschlüsse vermeiden und bei der Bezeichnung „Granula" bleiben.

Zur Färbung bzw. Fluorochromierung von lipoidhaltigen Zellstrukturen wird von STRUGGER (1938, 1949) das Rhodamin B empfohlen. Seine Verteilung in der lebenden Zelle soll sich völlig mit der Verteilung der lipoiden Komponenten decken. Mit Rhodamin B vitalgefärbte Zwiebel-Oberepidermen weisen im Hellfeld nach STRUGGER eine Chondriosomen(Ch.)- und eine Plasmafärbung auf, im Fluorescenzmikroskop ist eine Plasma-, Kernmembran- und vor allem intensive Ch.-Fl. zu beobachten. YAMAHA (1938) dagegen gelingt mit Rhodamin B keine Färbung der Ch. von Zwiebelepidermen. Auch DRAWERT (1953) erhält mit Rhodamin B — abgesehen von einer Ausnahme — an Zwiebelepidermen keine Ch.-Fluorescenz. JOHANNES (1942) gelingt mit Rhodamin B eine Vitalfärbung (Hellfeld) der Ch. von *Saprolegnia* und von *Basidiobolus ranarum*; fl.mikrosk. sind die Hyphen nicht genau zu analysieren, da außer den Ch. auch alle Fetttröpfchen intensiv fluorescieren.

Für meine Untersuchungen verwendete ich Janusgrün B (IG; Vorkriegsware) 1:20000 in Leitungswasser gelöst, 0,1%ige Lösung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Merck) in Leitungswasser, Nadi-Gemisch I nach PERNER (1952) (Reagenzien von Merck) und Rhodamin B (Merck) 1:1000 oder 1:10000 in Leitungswasser gelöst. Die Färbung des mit Leitungswasser bzw. Pufferlösung abgespülten Mycels führte ich folgendermaßen durch:

Janusgrün B: Die Mycelien wurden in Farblösung untersucht, weil so die Fl.-Erscheinungen, die das reduzierte Janusgrün B hervorruft, schneller und intensiver auftreten, als wenn Hyphen benutzt werden, die nur eine bestimmte Zeit gefärbt und dann in Leitungswasser übertragen wurden. Die Präparate ließ ich 2 min offen liegen, bevor ich das Deckglas auflegte, da mit Janusgrün nur bei guter O_2-Versorgung eine „Chondriosomen"-Färbung zu erzielen ist. Zur Beobachtung im Hellfeld blieben die Präparate unumrandet; zur Beobachtung der Reduktion des Farbstoffes umrandete ich die Deckgläser mit Vaseline.

TTC: Die Hyphen wurden in TTC-Lösung untersucht. Die Deckgläser legte ich wie beim Janusgrün nach 2 min auf und umrandete sie mit Vaseline.

Nadi-Reaktion: Auf Objektträgern wurde jeweils ein großer Tropfen frisch bereiteten Nadi-Gemisches aufgetragen, darin etwas *Mucor*-Mycel eingelegt und eine Weile offen liegengelassen. Die Deckgläser legte ich nach verschieden langen Zeiten auf. In dem Nadi-Gemisch trat immer bald Autoxydation ein.

Rhodamin B: Die Objekte färbte ich 1 bis 15 Minuten, z. T. untersuchte ich sie auch in der Farblösung.

Die Versuche wurden mit 18—22 Std altem submersen Mycel von *Mucor racemosus* durchgeführt.

a) Analyse im Hellfeld- und im Phasenkontrastmikroskop.

Im Hellfeld ist die Plasmagrundsubstanz hyalin oder auch körnig-schollig. Außer den Vacuolen sind i. a. nur viele kleine, etwas dunklere Granula zu erkennen, die mit der Ölimmersion gerade noch wahrnehmbar sind. Sie dürften reich an Lipoiden sein, da sie eine Lichtbrechung besitzen, wie sie für Lipoidtropfen charakteristisch ist. Diese Granula werden durch Nilrot und reduziertes Nilblau R elektiv vital fluorochromiert. Besonders häufig sind sie an den Rändern von Vacuolen zu finden. Manchmal sind auch andeutungsweise stäbchenförmige Gebilde zu sehen.

Im Phasenkontrast erscheint der Inhalt eines Teiles der Hyphen körnig-schollig, besondere Strukturen sind nicht zu erkennen. In anderen Hyphen dagegen gibt die Plasmagrundsubstanz einen mehr oder weniger homogenen grauen Phasenkontrast. Hier sind die Granula gut zu sehen, ihr Phasenkontrast ändert sich beim Heben oder Senken des Tubus, wodurch ein ähnlicher Effekt wie bei der Lichtbrechung im Hellfeld zustande kommt. Außer den Granula sind in den Hyphen noch Kerne und gelegentlich der Form nach typische Chondriosomen zu beobachten. Die Gebilde, welche ich als Chondriosomen bezeichnen möchte, sind klein und stäbchenförmig (i. a. ziemlich kurz), sie geben einen grauschwarzen Phasenkontrast. Die Ch. können aber nur selten beobachtet werden, am häufigsten kommen sie in Hyphenspitzen vor. Die Ch. werden durch Nilrot nicht fluorochromiert. Sie scheinen recht labile Gebilde zu sein. In den mit Nilblau, TTC oder dem Nadi-Gemisch behandelten Hyphen konnte ich sie nie beobachten.

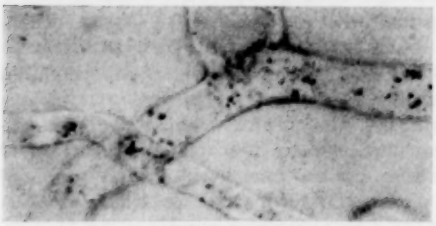


Abb. 3. Granulafärbung in Hyphen von *Mucor racemosus* mit Janusgrün B.

b) Färbung mit Janusgrün B.

Im Hellfeld sind in einem Teil der Hyphen die Granula (Gr.) blau gefärbt; Abb. 3 gibt ein Hyphenstück mit Gr.-Färbung wieder. Oft sind in einer Hyphe nicht alle Gr. gleichzeitig gefärbt. Es kann beobachtet werden, wie sich Gr. entfärben, während sich andere anfärben; die Anfärbung von Gr. ist in den Präparaten nur kurz nach der Deckglasauflage zu sehen. Neben den gefärbten Gr. sind manchmal kleine gefärbte Stäbchen zu erkennen, bei denen es sich offensichtlich um Chondriosomen handelt. Die gefärbten Ch. konnte ich aber nicht genau untersuchen, da sie sich immer sehr bald abrundeten und das Aussehen von gefärbten Gr. annahmen. Die mit Janusgrün gefärbten Gr. vergrößern sich etwas. Außer der Gr.-Färbung ist vereinzelt noch eine schwache diffuse Plasmafärbung und auch eine Membranfärbung (vor allem an den Hyphenspitzen) vorhanden.

In den Präparaten ist bald (etwa nach 10—20 min) in einem Teil der Hyphen die Reduktion des Janusgrüns zur roten Stufe zu beobachten. Die Hyphen färben sich rot. Vorwiegend sind das Plasma und die Vacuolen gefärbt, gelegentlich auch nur das Plasma bzw. nur die Vacuolen. Nach 1—2 Stunden erscheint in einigen Hyphen eine grünlichgelbe bis weißgrüne Gr.-Fl., die durch die farblose Reduktionsstufe des Janusgrüns bedingt wird. Nach mehreren Stunden, manchmal auch erst nach 1—2 Tagen fluorescieren in allen lebenden Hyphen die Gr. mehr oder weniger intensiv. Die Fl. ist nicht so intensiv wie die durch reduziertes

Nilblau R hervorgerufene GF, durch H_2O_2 wird sie gelöscht (Blaulicht und UV). — In einigen wenigen Hyphen trat zu Beginn der Reduktion zur farblosen Stufe eine diffuse gelbliche Plasma-Fl. auf.

Die Granula, die sich mit Janusgrün im Hellfeld färben, sind mit den Gr. identisch, die durch Nilrot, reduziertes Nilblau R und durch Leukojanusgrün fluorochromiert werden. Die gelegentlich zu beobachtenden, sich ebenfalls mit Janusgrün färbenden Chondriosomen werden — wie bereits erwähnt — nicht durch Nilrot fluorochromiert, unter dem Einfluß der Farbstoffe runden sie sich aber bald ab und bekommen das Aussehen der Granula.

c) Färbung mit TTC.

In einem Teil der Hyphen weist das Cytoplasma pathologische Veränderungen auf; ob diese Hyphen tot sind, habe ich nicht geprüft. Ungefähr 20 min nach Ansetzung der Präparate beginnt sich in den Hyphen mit normaler Plasmakonfiguration rotes Formazan niederzuschlagen. Das Formazan entsteht — wenigstens zu Anfang — ausschließlich an den Granula. Nach einer guten Stunde sind in vielen Hyphen mit normalem Plasmazustand an den Gr. feinkörnige Formazanniederschläge vorhanden; z. T. sind bereits größere im Plasma liegende Formazankristalle zu sehen, die später häufiger auftreten. Durch die im Plasma und auch im Außenmedium entstehenden Formazankristalle werden die Präparate unübersichtlich, so daß es sich i. a. nicht lohnt, sie länger als eine Stunde zu beobachten. Die TTC-Präparate zeigen keine Fluorescenz. — Abb. 4 gibt eine Hyphe mit Formazanbildung an den Granula wieder.

Abb. 4. Hyphe von *Mucor racemosus* mit Formazanbildung an den Granula.

Zu Beginn der Reduktion färbt das Formazan nicht die ganzen Gr., sondern es schlägt sich an einigen Stellen der Gr.-Oberfläche nieder. In den TTC-Präparaten ist das allerdings wegen der Kleinheit der Gr. nicht mit völliger Sicherheit zu erkennen. Es gelang mir aber in Mycel, das mit Janusgrün und TTC doppelt gefärbt wurde, einige Hyphen zu beobachten, in denen die Formazanbildung bereits eintrat, ehe sich die mit Janusgrün tingierten Gr. entfärbt hatten. Hier war deutlich zu sehen, wie an der Oberfläche der blau gefärbten und etwas vergrößerten Gr. winzige rote Formazanpunkte entstanden. Später verblaßte die Janusgrünfärbung, während die Formazanpunkte erhalten blieben.

d) Nadi-Reaktion.

Das Mycel wurde verschieden lange offen im Nadi-Gemisch liegengelassen. Nach ca. 2 min war vereinzelt, nach 5—10 min war in vielen Hyphen eine positive Nadi-Reaktion zu beobachten. Das Indophenolblau trat ausschließlich an bzw. in den Granula auf. Zu Anfang war die Reaktion nur schwach und ich konnte nicht entscheiden, ob das Indophenolblau wie das Formazan an den Gr. gebildet wird oder ob es diese gleich homogen färbt. Die Gr. vergrößerten sich etwas und die Nadi-Reaktion wurde intensiver. Nach etwa 15 min enthielt der größte Teil der Hyphen tief blau tingierte Garnula. In diesem Stadium waren eindeutig die ganzen Gr. durch das Indophenolblau gefärbt. Blieb das Mycel noch länger im Nadi-Gemisch liegen, schwollen die Gr. zu größeren blauen Kugeln an. — Abb. 5 gibt einige Hyphen wieder, deren Gr. positive Nadi-Reaktion zeigen.

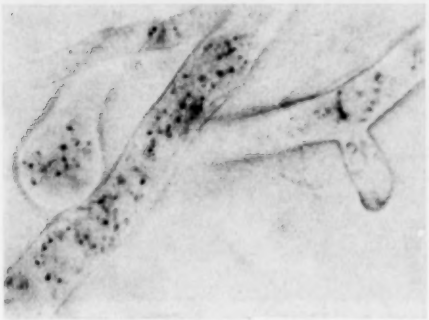


Abb. 5. Granulafärbung in Hyphen von *Mucor racemosus* mit Indophenolblau (Nadi-Reaktion).

e) Färbung mit Rhodamin B.

Sowohl an *Mucor* als auch an *Basidiobolus* erhielt ich mit Rhodamin B keine Fluorescenz von Granula oder anderen Strukturen, nur die Plasmagrundsubstanz fluorescierte diffus. Im Hellfeld (grünes Licht) konnte ich ebenfalls keine Färbung der Gr. feststellen. Versuche, mit Rhodamin B an Zwiebel-Oberepidermen eine Chondriosomen-Fl. zu erzielen, verliefen mit einer Ausnahme ebenfalls negativ. Nur bei einer Zwiebel trat neben der Plasma- und Kernmembran-Fl. auch eine intensive Chondriosomen-Fl. auf.

f) Ergebnisse und Diskussion der Versuche mit Janusgrün B, TTC, dem Nadi-Gemisch und Rhodamin B.

In dem submersen, 18—22 Std alten *Mucor racemosus*-Mycel kann i. a. nur eine Sorte von Granula festgestellt werden, eine Unterscheidung zwischen Mitochondrien und Sphärosomen wie bei der höheren Pflanze (vgl. DRAWERT 1953 und PERNER 1953, Abb. 2) ist nicht möglich. Mit den hier verwendeten Farbstoffen lassen sich die *Mucor*-Granula — wie in Tabelle 4 angeführt — charakterisieren, zum Vergleich wird das Verhalten der Mitochondrien bzw. Sphärosomen von Zwiebel-Oberepidermen angegeben.

Die *Mucor*-Granula besitzen also Eigenschaften, die teils den Mitochondrien, teils den Sphärosomen von *Allium cepa* zukommen. BAUTZ

Tabelle 4. *Vergleich der vitalfärberischen Eigenschaften der Mucor-Granula und der Mitochondrien und Sphärosomen von Allium cepa.*

	Mucor racemosus, Granula	*Allium*-Oberepidermen	
		Mitochondrien	Sphärosomen
Janusgrün B	Färbung	Färbung (DRAWERT 1953)	keine Färbung (DRAWERT 1953)
Leukojanusgrün	Fluorescenz	keine Fluorescenz (DRAWERT 1953)	Fluorescenz (DRAWERT 1953)
Nilrot	Fluorescenz	keine Fluorescenz (diese Arbeit und DRAWERT 1952, 1953)	Fluorescenz (diese Arbeit und DRAWERT 1952, 1953)
Reduziertes Nilblau R	Fluorescenz	keine Fluorescenz (diese Arbeit und DRAWERT 1952, 1953)	Fluorescenz (diese Arbeit und DRAWERT 1952, 1953)
Formazan (TTC-Reduktion)	keine direkte Färbung, die ersten Formazanniederschläge sind aber an den Granula zu beobachten	keine Färbung (ZIEGLER)	Färbung (ZIEGLER)
Indophenolblau (Nadi-Reaktion)	Färbung	keine Färbung (PERNER 1952)	Färbung (PERNER 1952)
Rhodamin B	keine Fluorescenz	teilweise Fluorescenz	keine Fluorescenz

(1954, 1955a, b) und STEINER und HEINEMANN (1954b) haben an den von ihnen untersuchten Pilzen ähnliche Beobachtungen gemacht. — Besonders auffällig ist, daß die *Mucor*-Granula nicht wie die Sphärosomen das gut lipoidlösliche Formazan speichern. Auch nach BRINGMANN (1953 und persönliche Mitteilung) schlägt sich bei *Penicillium chrysogenum* das Formazan an den mit Janusgrün färbbaren Orten nieder, ohne von diesen selbst gespeichert zu werden.

Wie die Versuche eindeutig zeigen, kann man nicht ohne weiteres schließen, daß ein im Modellversuch in einigen hydrophoben Medien gut löslicher Stoff in der lebenden Zelle alle lipoiden Strukturen färbt bzw. fluorochromiert. Nilrot, Indophenolblau, Formazan, Rhodamin B, reduziertes Nilblau R und Leukojanusgrün sind alle stark lipophile Stoffe, und es ist anzunehmen, daß ihre Speicherorte in der Zelle einen Lipoidcharakter besitzen. Trotzdem decken sich ihre Speicherorte in der lebenden Zelle nur zum Teil. Sie ermöglichen dadurch eine Unterscheidung zwischen verschiedenen lipoidreichen Strukturen. Die Frage, warum sich z. B. die Verteilung von Rhodamin B mit der des Nilrotes in der Zelle nicht deckt, obwohl beide Substanzen im Modellversuch eine gute Lipoidlöslichkeit besitzen, können wir heute noch nicht beantworten,

ebensowenig wie wir dafür eine befriedigende Erklärung geben können, warum chemisch so verschiedene Substanzen wie Nilrot, Indophenolblau und Leukojanusgrün (Leukosafranin) in ein und denselben Zellorganellen gespeichert werden. Wir müssen annehmen, daß sowohl die physikalisch-chemischen wie die rein chemischen Eigenschaften eines Farbstoffes und auch des betreffenden Zellorganells für die Speicherung von Bedeutung sind. Je nach den vorliegenden Verhältnissen wird die Speicherung in einem Fall mehr nach chemischen, in einem anderen Fall mehr nach physikochemischen Gesetzmäßigkeiten erfolgen oder auch ausbleiben.

Die Gegenüberstellung der vitalfärberischen Eigenschaften der *Mucor*-Granula und der Mitochondrien sowie Sphärosomen von *Allium cepa* hat ferner gezeigt, daß einander nicht homologe Gebilde durch gleiche Farbstoffe angefärbt werden können (Beispiele: Janusgrünfärbung der Granula und Mitochondrien; Fluorochromierung der Granula und Sphärosomen durch Nilrot). Nur die Heranziehung von mehreren Farbstoffen macht es möglich, einerseits die Granula, andererseits die Mitochondrien und Sphärosomen *(Allium)* zu charakterisieren. Aus der Färb- bzw. Fluorochromierbarkeit von Zellbestandteilen mit einem bestimmten Farbstoff darf nicht ohne weiteres auf deren Homologie geschlossen werden.

Außer den Granula sind in den *Mucor*-Hyphen noch gelegentlich Chondriosomen zu beobachten, die durch Janusgrün B gefärbt, durch Nilrot aber nicht fluorochromiert werden. Es sind labile Gebilde, die sich leicht in Granula umwandeln. In Janusgrünpräparaten kann die Umwandlung der gefärbten Stäbchen in gefärbte Granula direkt beobachtet werden. Es besteht die Möglichkeit, daß die Chondriosomen und die Granula verschiedene Zustandsformen ein und desselben Zellorganelles sind, daß die Granula aus den Chondriosomen entstehen. Tarwidowa (1938) und Steiner u. Heinemann (1954 b) haben an ihren Objekten ähnliche Beobachtungen gemacht.

Es erhebt sich die Frage, ob die Granula evtl. keine normalerweise in den Hyphen vorkommende Gebilde sind, sondern selbst in den ungefärbten Hyphen erst durch die Präparation (Deckglasauflegung u. a.) aus Chondriosomen entstehen. Diese Frage glaube ich verneinen zu können, da auch bei behutsamster Behandlung des Mycels in den Hyphen stets Granula zu beobachten sind. Chondriosomen dagegen sind nicht immer vorhanden. Sie scheinen für junge Hyphen charakteristisch zu sein, denn man kann sie am häufigsten in den Hyphenspitzen finden, in den mehr basalwärts liegenden Teilen der Hyphen sind praktisch nur Granula zu erkennen.

Von den Chondriosomen ist seit langem bekannt (vgl. z. B. Meissel 1938), daß sich ihre Gestalt mit der physiologischen Leistung und dem Alter der Zelle ändert. Die hier verwendeten Vitalfarbstoffe und einige

weitere (z. B. Berberinsulfat), deren Verhalten gegenüber lebenden Zellen z. T. erst in neuerer Zeit mikroskopisch bzw. fluorescenzmikroskopisch untersucht worden ist, ermöglichen eine mehr oder weniger eindeutige Charakterisierung der in der lebenden Zelle vorhandenen Einschlüsse. Es wäre z. B. von Interesse zu prüfen, welche färberischen Unterschiede die cytoplasmatischen Einschlüsse von Pilzen aufweisen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden. Solche Untersuchungen, mit möglichst vielen dazu geeigneten Vitalfarbstoffen durchgeführt, könnten vielleicht darüber Aufschluß geben, wieviel verschiedene Zustandsformen von „Chondriosomen" auftreten und ob es sich dabei um Metamorphosen ein und desselben Zellorganells handelt; ferner wäre vielleicht eine Entscheidung darüber möglich, ob die bei den verschiedenen Pflanzengruppen zu beobachtenden Cytoplasmaeinschlüsse wirklich identisch sind und ob es berechtigt ist, sie mit einem gemeinsamen Namen zu belegen.

Durch die Fluorochromierung mit dem Fettfarbstoff Nilrot ist es auch an der lebenden *Allium*-Epidermiszelle gelungen, den Lipoidreichtum der Sphärosomen nachzuweisen. Die Annahme Perners (1952), daß das bei der Nadi-Reaktion gebildete Indophenolblau nicht sekundär auf Grund seiner Lipoidlöslichkeit in den Sphärosomen gespeichert wird, sondern dort primär entsteht und den Sitz der Cytochromoxydase anzeigt, ist doch recht unwahrscheinlich. Genau so wie das Nilrot und das Formazan reichert sich wohl auch das Indophenolblau auf Grund seiner Lipophilie sekundär in den an Lipoiden reichen Strukturen, den Sphärosomen an (vgl. Drawert 1953, 1954, und Ziegler).

Aus der Speicherung des Indophenolblaus in den *Mucor*-Granula dürfen wir also ebenfalls nicht schließen, daß die Granula Cytochromoxydase enthalten. Die Beschleunigung der Indophenolblausynthese in den Hyphen im Vergleich zum Außenmedium ist zwar auf zelleigene Oxydationsfermente zurückzuführen, das entstehende Indophenolblau dürfte aber an seinen Speicherorten lipoide Strukturen anzeigen. Es besteht natürlich die Möglichkeit, daß die Cytochromoxydase in der Zelle an Orten lokalisiert ist, die durch einen hohen Lipoidgehalt ausgezeichnet sind. Diese Orte werden dann auch das Indophenolblau speichern, aber nicht weil sie der Sitz der Cytochromoxydase sind, sondern weil sie viel Lipoide enthalten.

Es erhebt sich die Frage, ob überhaupt ein Nachweis von Oxydations- oder Reduktionsorten in der lebenden Zelle möglich ist. Nach Drawert (1954) verteilt sich ein Stoff auf Grund seiner lipo- und hydrophilen Eigenschaften in der Zelle soweit nicht rein chemische Reaktionen vorliegen. Durch Reduktion oder Oxydation eines Stoffes in der lebenden Zelle werden seine physiko-chemischen Eigenschaften geändert und damit auch seine Verteilung. Aus dem Verteilungsbild kann nicht

erschlossen werden, wo die Reduktion oder die Oxydation wirklich stattgefunden haben.

Unter gewissen Umständen kann uns vielleicht aber doch die Lokalisation des Formazans Hinweise auf Reduktionsorte geben, nämlich dann, wenn keine das Formazan speichernden Strukturen vorliegen. Das scheint in den Hyphen von *Penicillium chrysogenum* (BRINGMANN 1953) und von *Mucor racemosus* der Fall zu sein. Hier fällt das Formazan in den Hyphen als Niederschlag aus. Wenn die ersten Formazanniederschläge an den mit Janusgrün färbbaren Orten erscheinen, können diese wohl mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit als Sitz von Redoxfermenten angesehen werden, die eine Reduktion des TTC bewirken. Ein sicherer Nachweis ist das aber auch nicht, da das Formazan auch sekundär durch Oberflächenkräfte an die Granula gebunden werden könnte.

Zu einem eindeutigen Nachweis von Oxydations- oder Reduktionsorten könnte man wahrscheinlich durch Verwendung von solchen Stoffen kommen, deren (sichtbare) Oxydations- bzw. Reduktionsprodukte zwar in der lebenden Zelle entstehen, dort aber nicht gespeichert oder niedergeschlagen werden, sondern nur während des Oxydations- bzw. Reduktionsprozesses zu sehen sind. In diesem Zusammenhang sind die von JOYET-LAVERGNE (Zusammenfassung 1934) zum Nachweis von Oxydationsorten durchgeführten Arbeiten von Interesse. Der Autor benutzt unter anderem reduzierte Farbstoffe zur Färbung der Chondriosomen. Die den Zellen gebotenen Leukoderivate werden nach der Auffassung von JOYET-LAVERGNE an den Chondriosomen reoxydiert, wodurch sich diese färben; leider gibt der Autor nicht an, unter welchen Bedingungen (pH des Außenmediums) er arbeitete. TARWIDOWA (1938) verwendete in Anlehnung an JOYET-LAVERGNE Leukomethylenblau zur vitalen Färbung der Chondriosomen von *Basidiobolus ranarum*. Das Leukomethylenblau stellte sie durch vorsichtige und langsame Reduktion von Methylenblaulösung mit $Na_2S_2O_3$ unter Zusatz von etwas n/10 HCl her, sie arbeitete also bei saurer Reaktion.

Mit Mycel von *Basidiobolus*, das ich auf Agar in einem kleinen Glasschälchen herangezogen hatte, machte ich einen orientierenden Versuch. Die Hyphen wurden mit dem nach TARWIDOWA bereiteten Leukomethylenblau überschichtet und unter Luftzutritt mit der Wasserimmersion beobachtet. In den Hyphen reoxydierte sich das Leukomethylenblau schneller als im Außenmedium, in Übereinstimmung mit TARWIDOWA konnte ich „Chondriosomen-" und Nucleolus-Färbung beobachten. Die Färbung war nur so lange vorhanden, wie die Reoxydation des Leukomethylenblaus dauerte, wenn dieses reoxydiert war, verschwand sie. Die Zellen wurden nicht sichtbar geschädigt, sie ließen sich plasmolysieren und deplasmolysieren.

Das Ergebnis kann folgendermaßen gedeutet werden: Oxydiertes Methylenblau ist zur Permeation befähigt, wird aber bei saurer Reaktion des Außenmediums i. a. von lebenden Zellen nicht gespeichert. Das hier gebotene Leukomethylenblau kann in die Zellen des Pilzes eindringen und wird dort durch Oxydasen reoxydiert. Unter den gegebenen Bedingungen (saures Medium) findet keine Speicherung des entstehenden Methylenblaus statt, es wandert in das Außenmedium ab. Solange aber der Prozeß der Reoxydation läuft, erscheinen die Orte in den Zellen blau gefärbt, an bzw. in denen das Methylenblau entsteht. Ist alles Leukomethylenblau reoxydiert, verschwindet auch die Blaufärbung, da für das Methylenblau keine Speicherungsmöglichkeit besteht. Falls sich diese Deutung in weiteren Versuchen, über die ich in einer folgenden Arbeit berichten werde, bestätigen sollte, dürfte auf diese Art und Weise ein sicherer Nachweis von Oxydationsorten in der lebenden Zelle möglich sein.

Der bei der Reoxydation des Leukomethylenblaus geschilderte Mechanismus kann auch bei der Nadi-Reaktion auftreten. So gibt Zweibaum (1923a, b) an, daß in tierischen Zellen, die mit Nadi-Gemisch behandelt wurden, Granula vorhanden sind, die sich im Gegensatz zu den Fetttropfen nur vorübergehend färben und die die „granulations oxydasiques" darstellen sollen. Wahrscheinlich hat Zweibaum neben den sekundären Speicherorten, den Fetttropfen, auch die primären Entstehungsorte des Indophenolblaus beobachtet, die nur so lange gefärbt waren, wie die Indophenolblausynthese ablief.

Zusammenfassung.

In Nilblaupräparaten des Handels kann stets Nilrot nachgewiesen werden. Das Nilblau wird von der lebenden Pflanzenzelle vor allem in der Vacuole ohne Fluorescenzerscheinungen gespeichert. In den mit Nilblau behandelten Zellen ist eine Fluorescenz der lipoiden Strukturen (Granula, Sphärosomen, Öltropfen) zu beobachten. Die fluorochromierten Strukturen erscheinen im Hellfeld farblos. Das in den vorliegenden Untersuchungen hauptsächlich benutzte submerse *Mucor*-Mycel zeigt nach der Vitalfärbung viele kleine fluorescierende Granula.

Es treten bei Behandlung mit „Nilblau" zwei verschiedene, sich überdeckende Typen von Granulafluorescenz (GF) auf. Erstens eine relativ schwache GF, die von der Sauerstoffspannung unabhängig ist und die durch das Nilrot hervorgerufen wird; zweitens eine intensive GF, die nur in lebenden Hyphen und nur bei O_2-Mangel auftritt. Dieser zweite Typ beruht darauf, daß das Nilblau bei Sauerstoffmangel von dem lebenden Pilz reduziert wird und die reduzierte Form des Farbstoffes eine intensive GF hervorruft.

Wird Nilrot mit Wasser gekocht, gehen geringe Spuren davon in Lösung. Mit der so gewonnenen Nilrotlösung läßt sich in lebenden und toten *Mucor*-Hyphen eine GF erzielen, die von der Sauerstoffversorgung unabhängig ist.

In einer bestimmten Zellsorte werden durch Nilrot und durch reduziertes Nilblau stets dieselben Strukturen fluorochromiert. Dagegen sind die bei den verschiedenen Objekten fluorescierenden Zellbestandteile nicht miteinander identisch. In den Oberepidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* tritt eine Sphärosomenfluorescenz, in Pilzmycelien eine Granula- und Öltropfenfluorescenz auf.

Aus Modellversuchen wird geschlossen, daß die durch Nilrot bzw. reduziertes Nilblau fluorochromierten Strukturen reich an Lipoiden sein müssen.

Wird Nilblau in Leitungswasser gelöst und gekocht, so tritt eine „Zersetzung" ein. Die gekochte und filtrierte farblose Lösung (Z-Lösung) ruft eine intensive, vielfarbige GF hervor, die von O_2 nicht beeinflußt wird. In der Z-Lösung können chromatographisch Nilrot und zwei weitere fluorescierende Komponenten nachgewiesen werden, aber nicht mehr Nilblau.

Die unter dem Namen „Nilblausulfat" in den Handel kommenden Nilblaupräparate enthalten, soweit sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, kein Sulfat als Anion.

Zur Identifizierung der in den Hyphen des submersen *Mucor*-Mycels vorhandenen und mit Nilrot sowie mit reduziertem Nilblau fluorochromierbaren Granula wurden vergleichende Untersuchungen mit Janusgrün B, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), der Nadi-Reaktion und Rhodamin B durchgeführt. Die Granula besitzen Eigenschaften, die teils den Mitochondrien, teils den Sphärosomen der höheren Pflanze zukommen. Neben den Granula können in den *Mucor*-Hyphen gelegentlich noch ihrer Gestalt nach typische Chondriosomen beobachtet werden.

Das bei der Nadi-Reaktion entstehende Indophenolblau und das bei der TTC-Reduktion entstehende Formazan gestatten keinen eindeutigen Nachweis von Oxydations- bzw. Reduktionsorten in der lebenden Zelle. Unter Umständen können aber Stoffe zum Nachweis von Oxydations- oder Reduktionsorten dienen, deren Oxydations- bzw. Reduktionsprodukte zwar in der lebenden Zelle entstehen, dort aber nicht gespeichert oder niedergeschlagen werden. Ein in dieser Hinsicht unternommener Versuch mit Leukomethylenblau wird beschrieben.

Herrn Prof. Dr. H. DRAWERT danke ich für die Anregung der Arbeit. Ebenfalls bin ich Herrn Dr. E. W. SCHMIDT für Hinweise zu Dank verpflichtet.

Literatur.

Aubel, E., et L. Genevois: Sur le potentiel d'oxydoréduction de la levure, du bacterium coli et des milieux où croissent ces microorganismes. C. r. Acad. Sci. Paris **184**, 1676 (1927). — Barron, E. S. G., and L. A. Hoffman: The catalytic effect of dyes on the oxygen consumption of living cells. J. gen. Physiol. **13**, 483 (1930). — Bautz, E.: Untersuchungen über die Mitochondrien von Hefen. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 281 (1954). — Mitochondrienfärbung mit Janusgrün bei Hefen. Naturwiss. **42**, 49 (1955a). — Zytologische Untersuchungen an höheren Pilzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **68**, 197 (1955b). — Bautz, E., u. H. Marquardt: Die Grana mit Mitochondrienfunktion in Hefezellen. Naturwiss. **40**, 531 (1953a). — Das Verhalten oxydierender Fermente in den Grana mit Mitochondrienfunktion der Hefezellen. Naturwiss. **40**, 531 (1953b). — Sprunghafte Änderungen des Verhaltens der Mitochondrien von Hefezellen gegenüber dem Nadi-Reagens. Naturwiss. **41**, 121 (1954). — Becker, E. R.: Vital staining and reduction of vital stains by protozoa. Biol. Bull. **50**, 235 (1926). — Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 27, S. 419. Berlin 1937. — Brenner, S.: The non-specifity of the Nadi reaction for the cytochrome oxidase-cytochrome C system. S. Afric. J. Sci. **43**, 320 (1947). — Brin, G. P., i A. A. Krasnovskij: Der Einfluß der Verbindungen mit verschieden großem Redoxpotential auf Photosynthese und Atmung bei Elodea [Russisch]. Biochimija **16**, 453 (1951). Zit. nach Ber. wiss. Biol. **77**, 68 (1952). — Bringmann, G.: Phasenkontrast- und elektronenmikroskopische Beobachtungen an Penicillium chrysogenum. Zbl. Bakter. II **107**, 254 (1953). — Buchy, A.: Recherches quantitatives sur la coloration vitale des cellules de levures. Rev. Cytol. et Cytophysiol. végét. **5**, 265 (1941). — Chessin, R. W.: Die Isolierung der Zytoplasmagranula, ihr Bau und ihre Rolle im interzelligen Stoffwechsel. Sowjetwiss., naturwiss. Abt. **3**, 319 (1951). — Cohen, B., and P. W. Preisler: Studies on oxydation-reduction. XVI. The oxazines: nile blue, brillant cresyl blue, methyl capri blue and ethyl capri blue. Publ. Health Rep. Suppl. **92**, 1 (1931). — Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim 1953. — Czaja, A. Th.: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengeweben. II. Basische Farbstoffe. Planta (Berl.) **21**, 531 (1934). — Drawert, H.: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora (Jena) **134**, 159 (1940). — Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturforsch. **3b**, 111 (1948). — Beiträge zur Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. Protoplasma (Wien) **40**, 85 (1951). — Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblausulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. **65**, 263 (1952). — Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 134 (1953). — Vitalfärbung der Plastiden von Allium cepa mit Coelestinblau. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 33 (1954). — Die vitale Fluorochromierung der Sphärosomen (Mikrosomen) mit einem aliphatisch im N substituierten Aminopyren. Naturwiss. **42**, 419 (1955). — Drawert, H., u. H. Gutz: Zur vitalen Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblau. Naturwiss. **40**, 512 (1953). — Eisenberg, Ph.: Über Fettfärbung. Farbchemische und histologisch-technische Untersuchungen. Virchows Arch. **199**, 502 (1910). — Guilliermond, A.: Nouvelles observations cytologiques sur les Saprolégniacées. Cellule **32**, 431 (1922). — Sur la toxicité des colorants vitaux. C. r. Soc. Biol. Paris **104**, 468 (1930). — La coloration vitale des chondriomes. Bull. Histol. appl. **17**, 225 (1940). — The Cytoplasm of the Plant Cell. Waltham, Mass. 1941. — Guilliermond, A., et R. Gautheret: Culture de Saprolegnia diclina en milieux additionés de colorants. C. r. Soc. Biol. Paris **128**, 493 (1938a). — Culture de végétaux en milieux additionés de colorants. Degré de toxicité des colorants. C. r. Acad. Sci. Paris **206**, 1601 (1938b). — Actions de bleu de nil et de crésyl sur les levures: Réduction et excrétion de ces colorants par les

levures. C. r. Acad. Sci. Paris **206**, 1848 (1938c). — Recherches sur la coloration vitale des cellules végetales. Rev. gén. Bot. **52**, **53**, 353 u. Fortsetzungen (1940/1946). — GUTSTEIN, M.: Über die Reduktionsorte und Sauerstofforte der Zelle. Z. wiss. Mikrosk. **46**, 337 (1929). — HERXHEIMER, G.: Über Fettfarbstoffe. Dtsch. med. Wschr. **1901**, 607. — HÖFLER, K.: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie (Wien) **2**, 13 (1947). — JOHANNES, H.: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien. I. Flora (Jena) **134**, 58 (1940). — Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien. II. Protoplasma (Berl.) **36**, 181 (1942). — JOYET-LAVERGNE, PH.: La sexualisation cytoplasmique et les caractéres physicochimiques de la sexualité. Protoplasma (Berl.) **3**, 357 (1928). — Sur les caractères de sexualisation cytoplasmique d'un champignon: Pythium de Baryanum. C. r. Soc. Biol. Paris **111**, 588 (1932). — Nouvelles méthodes générales pour la recherche du chondriome. Leur application a l'étude des champignons. Cellule **43**, 45 (1934). — KELLER, R., u. J. GICKLHORN: Methoden der Bioelektrostatik. In ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. 5, Teil 2, S. 1189. 1932. — LANG, K.: Lokalisation der Fermente und Stoffwechselprozesse in den einzelnen Zellbestandteilen und deren Trennung. In Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952. — LAZAROW, A., and S. J. COOPERSTEIN: Studies on the mechanism of Janus green B staining of mitochondria. Exper. Cell Res. **5**, 56 (1953). — LENNERT, K., u. G. WEITZEL: Zur Spezifität der histologischen Fettfärbungsmethoden. Z. wiss. Mikrosk. **61**, 20 (1952). — LETORT, M.: Sur cinq nouveaux indicateurs d'oxydoréduction. C. r. Acad. Sci. Paris **194**, 711 (1932). — LINDBERG, O., u. L. ERNSTER: Chemistry and physiology of mitochondria and microsomes. In HEILBRUNN u. WEBER, Protoplasmatologia, Bd. III, A 4. Wien 1954. — LISON, L.: Sur la mécanisme et la signification de la coloration des lipides par le bleu de Nil. Bull. Histol. appl. **12**, 279 (1935). — Histochimie et Cytochimie Animales. Paris 1953. — MEISSEL, M. N.: The alterations of chondriosomes of yeast organism in the course of respiration and fermentation. C. r. Acad. Sci. URSS., Nouv. sér. **20**, 479 (1938). — MICHAELIS, L.: Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgranula. Arch. mikrosk. Anat. **55**, 558 (1900). — MÖHLAU, R., u. K. UHLMANN: Zur Kenntnis der Chinazin- und Oxazinfarbstoffe. Liebigs Ann. **289**, 90 (1896). — PERNER, E. S.: Zellphysiologische und zytologische Untersuchungen über den Nachweis der Cytochromoxydase in Allium-Epidermiszellen. Biol. Zbl. **71**, 43 (1952). — Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. Protoplasma (Wien) **42**, 457 (1953). — RIED, W.: Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthese und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. Angew. Chem. **64**, 391 (1952). — RITCHIE, D., and P. HAZELTINE: Mitochondria in Allomyces under experimental conditions. Exper. Cell Res. **5**, 261 (1953). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München 1948. — SCHMIDT, J.: Die organischen Säuren. In KLEINS Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. II/1, S. 362. Wien 1932. — SMITH, J. L.: On the simultaneous staining of neutral fat and fatty acids by oxazine dyes. J. of Path. **12**, 1 (1908). — SPEK, J.: Metachromasie und Vitalfärbung mit pH-Indikatoren. Protoplasma (Berl.) **34**, 533 (1940). — Eine optische Methode zum Nachweis von Lipoiden in der lebenden Zelle. Protoplasma (Berl.) **37**, 49 (1943a). — Optische Analyse von Vitalfärbungen. Jena. Z. Naturwiss. **77**, 48 (1943b). — STEINBERG, R. A.: Action of some organic compounds on yield, sporulation and starch formation of Aspergillus niger. J. agric. Res. **60**, 765 (1940). — STEINER, M., u. H. HEINEMANN: Grana mit positiver Nadi-Reaktion als Ort der primären Fettbildung bei Pilzzellen. Naturwiss. **41**, 40 (1954a). — Über die Beziehungen zwischen den fettbildenden Grana und typischen Mitochondrien in den Zellen von Oospora lactis. Naturwiss. **41**, 90 (1954b). — STRUGGER, S.: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B. Protoplasma (Berl.) **30**, 85 (1938). — Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie

der Pflanze, 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949. — Tarwidowa, H.: Über die Entstehung der Lipoidtröpfchen bei Basidiobolus ranarum. Cellule **47**, 205 (1938). — Thorpe, J. F.: A reaction of certain coloring matters of the oxazine series. J. chem. Soc. Lond. **91**, 324 (1907). — Wallhäusser, K. H.: Die Darstellung der Zellteilungsvorgänge und des Wirkungsmechanismus antibiotischer Stoffe an vital gefärbten Bakterien. Arzneimittel-Forsch. **4**, 118 (1954). — Wehmer, C.: Mucoraceengärungen. In Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4, S. 455. 1907. — Yamaha, G.: Vitalfärbung an den Pollenmutterzellen von Lilium speciosum. Cytologia (Tokyo) **9**, 193 (1938). — Ziegler, H.: Über die Reduktion des Tetrazoliumchlorids in der Pflanzenzelle und über den Einfluß des Salzes auf Stoffwechsel und Wachstum. Z. Naturforsch. **8b**, 662 (1953). — Zweibaum, J.: Sur la coloration des graisses dans la cellule vivante. C. r. Soc. Biol. Paris **89**, 254 (1923a). — Sur l'utilisation du mélange „Nadi" et du bleu d'indophenol, formé in vitro, en technique histologique. C. r. Soc. Biol. Paris **89**, 256 (1923b). — Zweibaum, J., et G. Mangenot: Application a l'étude histochimique des végétaux d'une méthode permettant la coloration vitale et post-vitale des graisses de la cellule animale. C. r. Soc. Biol. Paris **89**, 540 (1923).

Dr. H. Gutz,
Mikrobiol. Abt. d. Inst. f. Gärungsgewerbe, Berlin N 65, Seestr. 13.

Planta, Bd. 46, S. 512—515 (1956).

Aus dem Biologischen Laboratorium der Österreichische Stickstoffwerke AG., Linz a. d. Donau (Leiter: Priv.-Dozent Dr. H. Linser).

ZUR PHOTOLYSE VON INDOL-3-ESSIGSÄURE BEI PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN ARBEITEN.

Von

Hubert H. Mayr.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 18. September 1955.)

Es ist eine bekannte Tatsache, daß Indolkörper, insbesonders Indol-3-essigsäure (I-3-E), bei Bestrahlung mit verschiedenen Strahlenarten der Photolyse unterliegen (Brauner 1953). Dieser Umstand muß bei allen Versuchen mit diesen Verbindungen, welche in der Pflanzenphysiologie als Wuchsstoffe eine große Rolle spielen, berücksichtigt werden. Die Untersuchungen, über die im folgenden berichtet wird, sollten darüber Aufschluß geben, ob und in welchem Umfang bei der Durchführung unserer Wuchsstoffversuche mit dem Einfluß der Photolyse von I-3-E gerechnet werden muß. Diese könnten vor allen Dingen während der Extraktion (Linser 1939, 1951; Linser, Maschek 1953; Linser, Mayr, Maschek 1954) und Papierchromatographie eintreten.

Als Strahlungsquelle für unsere Versuche wurde eine Hg-Dampflampe mit einem Stromdurchgang von 3,5 A im Dauerbetrieb mit einem Brenner von 20 mm Durchmesser und 170 mm Länge in einem Abstand von 280 mm verwendet. Die Bestimmungen der I-3-E bzw. ihrer photolytischen Folgeprodukte erfolgte papierchromatographisch. Die Verbindungen wurden in ätherischer Lösung auf Papier gebracht und mit dem Lösungsmittel i-Propanol : Wasser : Ammoniak (d = 0,91) = 80 : 15 : 5 (Vlitos und Meudt 1953) chromatographiert. Zur Entwicklung wurde Perchlorsäure-Eisenchlorid nach Gordon und Weber (1951) herangezogen. In den ersten Versuchen wurde eine praktisch wäßrige (2% Alkohol enthaltende) I-3-E-Lösung (40 γ I-3-E/cm^3) in einem offenen Becherglas (45 mm Durchmesser) in einer Schichtdicke von 4 mm und im Vergleich dazu eine entsprechende Lösung in 96% Alkohol von oben verschiedene Zeiten lang bestrahlt. In der nur 2% Alkohol enthaltenden Lösung trat unter diesen Bedingungen eine quantitative Zerstörung der I-3-E schon nach 30 min ein, während in 96%igem Alkohol diese erst nach 3 Std erfolgte.

Im weiteren wurden 20 cm^3 einer 10^{-1}%igen I-3-E-Lösung in 96%igem Alkohol in 14 mm dicker Schicht 4 Std lang wie beschrieben bestrahlt

und anschließend chromatographiert und entwickelt. Es traten 4 Spots auf (Indolkörper). Aus einem nicht entwickelten Chromatogrammstreifen wurden nun die Spots eluiert (LINSER, MAYR, MASCHEK 1954) und im Pastentest nach LINSER (1938, 1939) auf ihre Wuchsstoffwirksamkeit getestet. Das Ergebnis ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Man sieht, daß nur eine Verbindung (R_f 0,88) im Pastentest eine nicht ausreichend gesicherte Wirkung zeigt, während die Hauptmenge der Abbauprodukte wirkungslos ist; überhaupt scheint die Hauptmenge der I-3-E unter Ringssprengung abgebaut worden zu sein. Zwei Stoffe konnten wie die Tabelle 1 zeigt, nicht identifiziert werden. Es ist möglich, daß es sich bei einem davon um β-Indolaldehyd handelt (vgl. DENFFER, FISCHER 1952). Eine Bestrahlung von genügender Dauer von I-3-E-Lösungen wird also auf alle Fälle einen Wirkungsverlust im Hinblick auf Zellstreckungswirkung zur Folge haben. Die Bestimmung der I-3-E in einer dem Licht für mehrere Stunden ausgesetzten Lösung mit einer Farbreaktion ohne Abtrennung der indolartigen Abbauprodukte wird daher im Vergleich zum biologischen Test immer zu hohe Werte geben, ein Umstand der schon von BRAUNER (1953) erwogen wurde und nunmehr bestätigt erscheint. Auf Versuche, wo alkoholische I-3-E-Lösungen bestrahlt und nach verschiedenen Zeiten der I-3-E-Gehalt bestimmt wurde, wird später eingegangen. Es war zu erwarten, daß die Photolyse von I-3-E in alkoholischen Pflanzenextrakten anders als in reinem Alkohol verlaufen würde. Die zur Untersuchung dieser Frage verwendeten Pflanzenextrakte wurden wie folgt hergestellt: möglichst wenig Chlorophyll enthaltende junge Blätter normal herangezogener Pflanzen wurden gewogen, fein zerschnitten, mit der 4—5fachen Menge 96%igem Alkohol bei 1° C einige Stunden stehen gelassen und anschließend mit dem Lösungsmittel in einer Achatreibschale gut zerquetscht. Nach weiteren 24 Std Stehen bei 1° C wurde zentrifugiert, die Lösung bei 70° C abgedampft, der wäßrige Rückstand 6mal mit der 1,5fachen Menge Äther (peroxydfrei) gründlich ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Äthers konnte der Rückstand bis zur jeweiligen Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt werden. Es wurde nun Extraktionsrückstand von 10 g Frischsubstanz in 11 cm³ einer alkoholischen Lösung

Tabelle 1. *I-3-E-Äquivalente der Photolyseprodukte von I-3-E im Wuchsstofftest.*

R_f-Wert	Farbe des Spot	Verbindung identifiziert	I-3-E-Äquivalant im Pastentest γ	Prozent der ursprünglichen I-3-E-Menge
0,42	violettrot	I-3-E	64	10,5
0,58	violettrot	?	0	0
0,84	gelb	Skatol	0	0
0,88	orange	?	12,6	2 (nicht gesichert)

Bestrahlte Menge I-3-E: 624 γ; Bestrahlungsdauer: 4 Std.

Tabelle 2. *Totale Photolyse der I-3-E* (200 γ/11 cm³).

2% alkoholische Lösung		nach 30 min totalem Abbau
96% alkoholische Lösung		nach 190 min totalem Abbau
96% alkoholische Lösung	+ Extrakt von 10 g Frischsubstanz	nach 260 min totalem Abbau

von 200 γ I-3-E gelöst und unter den beschriebenen Bedingungen bestrahlt und papierchromatographiert.

Zur Verwendung gelangten Extrakte von Sprossenkohl *(Brass. oleracea var. gemmifera)* Wirsingkohl *(Brass. oleracea var. sabauda)* und Endivie *(Cichorium Endivia L.)*. Es zeigte sich dabei, daß der Zusatz der verschiedenen Pflanzenextrakte die Photolyse der I-3-E stark hemmt (Tabelle 2).

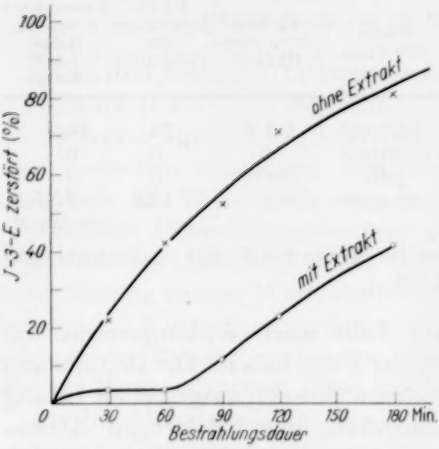


Abb. 1. Vergleich der Photolyse von I-3-E in alkoholischer Lösung mit und ohne Pflanzenextrakt (auf Filtrierpapier).

Die Variation der Menge des zugesetzten Extraktes zeigte, daß für 200 γ I-3-E ab 1 g Frischsubstanz eine Hemmung der Photolyse (im Vergleich zur reinen alkoholischen Lösung) eintrat, diese bis 5 g Frischsubstanz anstieg, größere Mengen aber keinen Einfluß mehr zeigten. Weiters wurde Sprossenkohlextrakt mit $2 \cdot 10^{-2}$%iger alkoholischer I-3-E-Lösung versetzt, so daß neben der im Extrakt natürlich vorliegenden Menge (von etwa 40 γ) auf 10 g Frischsubstanz 200 γ zugesetzte I-3-E in der Lösung enthalten war. Nach Überführung in ätherische Lösung wurde ein Teil davon auf Chromatogrammpapier (Whatman I) aufgetragen, getrocknet und verschiedene Zeiten belichtet, anschließend chromatographiert und entwickelt. Als Vergleich diente ein Versuch unter gleichen Bedingungen ohne Zusatz von Pflanzenextrakt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt Abb. 1. Der Zusatz des Extraktes hemmt die Photolyse für 1 Std Belichtung fast vollständig, erst nach dieser „Inkubationszeit" setzt der Abbau ein. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß besonders wäßrige Lösungen von I-3-E sehr lichtempfindlich sind und daher möglichst im Dunkeln gehalten werden sollen. I-3-E enthaltende reine alkoholische Lösungen sind schon viel weniger empfindlich und in alkoholischen Pflanzenextrakten ist die I-3-E für etwa 1 Std Belichtungsdauer vor Photolyse geschützt. Auf Chromatogrammpapier aufgetragen zeigt I-3-E die analoge Empfind-

lichkeit. Diese Ergebnisse wurden mit UV-Licht erhalten, bei gewöhnlichem künstlichem Licht bzw. Tageslicht wird die Photolyse entsprechend dem Energieinhalt der Strahlung langsamer oder schneller eintreten. Es empfiehlt sich jedenfalls die Manipulationen bei Wuchsstoffversuchen mit Indolverbindungen möglichst bei schwachem künstlichem Licht durchzuführen. Über die bei längerer Belichtung zu erwartenden Effekte wurde versucht in der vorliegenden Arbeit einen Überblick zu geben.

Literatur.

Brauner, L.: Untersuchungen über die Photolyse des Heteroauxins. Z. Bot. **41**, 291 (1953). — Denffer, D. v., u. A. Fischer: Papierchromatischer Nachweis des β-Indolaldehyds in photolytisch zersetzter Indolessigsäure-Lösung. Naturwiss. **39**, 549 (1952). — Gordon, S. A., and R. P. Weber: Colorimetric estimation of indolacetic acid. Plant Physiol. **26**, 192 (1951). — Linser, H.: Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. I. Planta (Berl.) **28**, 227 (1938). II. Planta (Berl.) **29**, 392 (1939). — Versuche zur chromatographischen Trennung von Wuchs- und Hemmstoffen. Planta (Berl.) **39**, 377 (1951). — Linser, H., u. F. Maschek: Colorimetrische und biologische Bestimmung sowie chromatographische Trennung von Wuchsstoffen aus Pflanzen. Planta (Berl.) **41**, 567 (1953).— Linser, H., H. Mayr u. F. Maschek: Papierchromatographie von zellstreckend wirksamen Indolkörpern aus Brassica-Arten. Planta (Berl.) **44**, 103 (1954). — Vlitos, A. J., and W. Meudt: The role of auxin in plant flowering. I. A. quantitative method based on paper chromatography for the determination of indole compounds and of 3-indoleacetic acid in plant tissues. Contrib. Boyce Thompson Inst. **17**, 197 (1953).

Dr. Hubert H. Mayr,
Biolog. Laboratorium d. Österr. Stickstoffwerke A.-G., Linz a. d. Donau.

Planta, Bd. 46, S. 516—544 (1956).

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen.

ÜBER DEN STOFFWECHSEL VON BRUTKNOSPEN IM LAUFE DER NACHREIFE.

(UNTERSUCHUNGEN AN *DENTARIA BULBIFERA**.)

Von

BRUNO KÖNEMANN.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Oktober 1955).

Die *Crucifere Dentaria bulbifera* bildet in ihren Blattachseln zu Zwiebeln gestauchte Seitenknospen („Brutknospen"). Diese vegetativen Fortpflanzungsorgane sind zum Zeitpunkt ihrer „Reife", d. h. der Ablösung von der Mutterpflanze, noch keineswegs keimfähig. Vielmehr benötigen sie, wie eine Reihe von Samen und Sporen, eine gewisse Ruhezeit, deren Dauer von verschiedenen äußeren Faktoren abhängt. Die Periode von der Reife bis zum Erreichen der Keimfähigkeit wird als „*Nachreife*" bezeichnet.

Über den Keimverzug von Samen sind zahlreiche Untersuchungen angestellt worden (vgl. LOOMIS 1949, RUGE und LIEDTGE 1951, BÜNNING und BAUER 1952). Demnach müssen die Samen eine Mindestwassermenge aufnehmen, ehe die ersten Mitosen des ruhenden Embryos beginnen können. Die junge Samenschale aber ist für Wasser weitgehend undurchlässig; dies ist in erster Linie durch den Bau ihrer Membran sowie deren chemische Zusammensetzung (Cutin) bedingt. Voraussetzung des Keimungsbeginns ist demnach eine teilweise *Aufhebung des Diffusionswiderstandes.* Es ist noch ungeklärt, welche Rolle dabei der Tätigkeit der Bodenmikroorganismen zugeschrieben werden muß.

Im „trockenen" Samen kommt es zu kolloidchemischen Umsetzungen, die zum Teil jahresperiodischen Schwankungen unterliegen (vgl. BÜNNING und BAUER 1952). Neben diesen physikochemischen Veränderungen aber laufen selbst zur Zeit der tiefsten Ruhe eine Reihe von Stoffwechselprozessen ab, erkennbar z. B. an der zunehmenden Wasserstoffionenkonzentration (ECKERSON 1913, ROSE 1919). Diese p_H-Veränderungen führen nun ihrerseits zur Aktivierung verschiedener Fermente und damit zu einer Kette weiterer Reaktionen. Ein Teil dieser stofflichen Veränderungen dürfte mit der Nachreife in ursächlichem Zusammenhang stehen: So liegen in eben erst gereiften

* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

Samen und Früchten häufig *Hemmstoffe* vor (vgl. z. B. Hemberg 1947, 1952, Borton und Solt 1948), die erst im Laufe der Nachreifeprozesse verschwinden. Zum anderen aber darf die Bedeutung des Abbaues von Keimungshemmstoffen für die Herstellung der Keimbereitschaft auch nicht überschätzt werden. Vielmehr müssen wir annehmen, daß es umgekehrt vielfach im Laufe der Nachreife zu einer *Bildung keimungsfördernder Substanzen* kommen kann (vgl. Vallance 1950, 1951, Luckwill 1952).

Im Laufe der letzten Jahre sind uns eine Reihe entwicklungsanregender Stoffe bekanntgeworden, die, wie etwa Brenztraubensäure und Acetaldehyd, im Laufe des physiologischen Kohlenhydratabbaues auftreten (Bünning 1953). Da die Samenschale nicht allein für Wasser, sondern ebenso für Gase schwer durchlässig ist (Stiles and Leach 1932), ist mit einer Beteiligung anaerober Atmungsprozesse am Kohlenhydratumsatz und damit der vorübergehenden Anreicherung von Atmungszwischenprodukten zu rechnen.

Es ist häufig mit Erfolg versucht worden, die Ruheperiode von Fortpflanzungsorganen abzukürzen. Ebenso wie bei Knospen haben sich auch bei Samen und Sporen verschiedene Mittel als wirksam erwiesen, so eine kurzfristige Kältebehandlung, Begasen mit Ätherdampf (Johannsen 1906) oder Blausäure (vgl. Bünning 1953) sowie die Behandlung mit verschiedenen Chemikalien, von denen hier nur Vitamin B_1, Äthylenglykol und Milchsäure erwähnt seien (Ruge 1948).

Eine *Abkürzung der Nachreife* ist auch für *Dentaria*-Brutknospen versucht worden, allerdings ohne positives Ergebnis (Aselmann 1910). In der vorliegenden Arbeit soll den Veränderungen nachgegangen werden, die sich im Laufe der Nachreife abspielen, soweit sich diese mit Hilfe moderner analytischer Verfahren erfassen lassen.

Methodik.

1. Sammlung und Aufbewahrung. Etwa 90000 Brutknospen wurden Mitte Juni 1954 im Göttinger Klosterforst gesammelt[1], auf Drahtnetzen ausgebreitet und im Thermostaten bei einer konstanten Temperatur von 16° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 86% aufbewahrt. Dadurch wurde ein Kontakt mit einem Keimsubstrat (Bodenbakterien!) verhindert, und der Gasaustausch konnte ungehindert erfolgen. Die gemessenen Veränderungen können demnach weitgehend als endogen angesehen werden. Eine Beeinflussung der Meßwerte durch einen Bakterienbefall der Brutknospen ist zwar nicht auszuschließen, erscheint jedoch wenig wahrscheinlich.

[1] Bereits im Juni 1953 waren rund 100000 Bulbillen gesammelt worden. Dieses Material diente zur Einübung der Methodik sowie für eine erste Versuchsserie. Einzelner methodischer Fehler wegen wurde aber auf die exakte Auswertung der damaligen Meßreihe verzichtet, obwohl deren Resultate gut mit denen der Hauptversuche (1954/55) übereinstimmten.

2. Konservierung des Versuchsmaterials. Für die Untersuchung des N-Stoffwechsels wurden in Abständen von 4 Wochen je 400—500 Brutknospen konserviert. Das dem Thermostaten entnommene Material wurde durch Trockeneis eingefroren, in einer Reibschale zerkleinert und im Vakuum einer zweistufigen Öldruckpumpe ($<$ 0,01 Torr) 8—10 Std lang getrocknet. Die Temperatur des Pulvers blieb während des gesamten Trocknungsprozesses unter dem Taupunkt des Materials. Das getrocknete Pulver wurde (bei 0° C) im Vakuum über Phosphorpentoxyd aufbewahrt.

Leider stand keine genügend leistungsfähige Anlage zur Verfügung, die eine Gefriertrocknung aller Bulbillen gestattet hätte. Daher wurden die Proben für die p_H-Messungen und Zuckeranalysen 3 Std bei 100° C getrocknet. Ein gewisser Verlust leichtflüchtiger Säuren ist dabei nicht auszuschließen (WOLF 1955); die Wasserstoffionenkonzentration ist daher vielleicht etwas zu niedrig gemessen worden. Die Aufbewahrung des Trockenmaterials erfolgte über Phosphorpentoxyd (im Exsiccator).

3. Keimproben. Die Versuche zur Bestimmung der Keimraten im Licht und im Dunkeln wurden erstmalig am 14. Juli 1954 mit je 600 Brutknospen durchgeführt. Diese wurden aus dem Thermostaten in Petrischalen übertragen, in denen sie auf Filtrierpapier, das mit 10 cm^3 Quellwasser angefeuchtet war, zur Keimung ausgelegt wurden. Die insgesamt 20 Schalen mit je 30 Brutknospen kamen zur Keimzahlbestimmung in einen Thermostaten (20° C), 10 für den Lichtversuch (Dauerlicht) und 10 für den Dunkelversuch (Dauerdunkel). Beleuchtung des Thermostaten mit einer durch einen Wassermantel gekühlten 100-Watt-Glühlampe. Beleuchtungsintensität in Höhe der Brutknospen $\sim$ 250 Lux. Die erste Kontrolle erfolgte nach 15 Tagen; weitere wurden im Abstand von jeweils 5 Tagen bis zum 30. Tag nach Versuchsbeginn durchgeführt. Nach jeder Zählung wurden die gekeimten Brutknospen entfernt.

4. Manometrische Messungen. *Atmungsintensität* und *Atmungsquotient* wurden nach der manometrischen Methode von WARBURG durch Messung der Druckunterschiede bei konstant gehaltenem Volumen bestimmt. Gemessen wurde der Gesamtsauerstoffverbrauch, einmal bei Absorption von CO_2 durch Kalilauge, dann ohne Absorption von CO_2, jeweils bei 17° C (im Dunkeln). Zu jedem Versuch wurden die durch 10 g Brutknospen (Frischgewicht) während einer Versuchsdauer von 100 min verursachten Druckänderungen gemessen. Eventuell auftretende Luftdruck- und Temperaturschwankungen des Wasserbades wurden durch Kontrollmessungen mit leerem Reaktionsgefäß ermittelt und bei der Auswertung der Messungen berücksichtigt.

Die Absolutmengen der umgesetzten Gasmengen konnten mit Hilfe des Eichvolumens der Kölbchen (Gefäßkonstante $\times$ Druckunterschied) errechnet werden. Die Größe des Atmungsquotienten ergab sich aus den oben angegebenen Parallelmessungen, nämlich aus der Differenz des Gesamtsauerstoffverbrauchs (bei Absorption des CO_2) und des Sauerstoffverbrauchs ohne Absorption des CO_2, dividiert durch den Gesamtsauerstoffverbrauch (vgl. UMBREIT, BURRIS und STAUFFER 1951).

5. Chemische Untersuchungen: *a) Bezugsgröße.* Die Analysenwerte wurden auf das Trockengewicht bezogen. Zu seiner Bestimmung, bzw. zur Ermittlung des Wassergehaltes, wurden 5 Proben mit je 1000 mg Brutknospen (Frischgewicht) ausgewogen und im Thermostaten bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Angabe der Trockengewichte erfolgte bei jeder Probe in Prozenten des Frischgewichts.

b) p_H*-Messung, qualitative und quantitative Analyse der Zucker.* p_H-Messungen und Zuckerbestimmungen wurden nach Abschluß der Vegetationsperiode in einem Arbeitsgang in Form einer Reihenuntersuchung durchgeführt. Die Bestimmungen konnten so unter völlig gleichen Versuchsbedingungen vorgenommen werden.

Die Extrakte für die p_H-Messungen und Zuckeranalysen wurden durch dreimalige Extraktion des Trockenmaterials gewonnen, und zwar 1. mit 96%igem Alkohol (50 cm^3), 2. mit 48%igem Alkohol (300 cm^3), 3. mit bidest. Wasser (100 cm^3). Die von 2 g Trockenpulver gewonnenen Extrakte wurden vereinigt, zentrifugiert und im Wasserstrahlvakuum auf 10 cm^3 eingeengt. Sie enthalten neben den Säuren und deren Salzen sowie den Zuckern eine große Anzahl von Pflanzeninhaltsstoffen. Eine weitere Fraktionierung erwies sich jedoch als überflüssig.

Das erhaltene Konzentrat diente für folgende Bestimmungen:

α) Wasserstoffionenkonzentration. Die Messungen wurden am Konzentrat des Extraktes — zur Kontrolle an einer Verdünnung dieser Probe — mit Hilfe der Glaselektrode durchgeführt.

β) Quantitative Bestimmung der reduzierenden Zucker. Sie erfolgte nach Hagedorn-Jensen (1923). Für jede Bestimmung dienten 20 mm^3 Konzentrat.

γ) Qualitative und halbquantitative Zuckerbestimmung durch die papierchromatographische Analyse. Als *Lösungsmittel* fanden Verwendung: 1. n-Butanol-Dimethylformamid-Wasser 2:1:1 (Cramer 1954), 2. n-Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5, organische Phase (Cramer 1954). Die Trennung der Zucker konnte infolge der geringen Anzahl der Komponenten eindimensional (aufsteigend) durchgeführt werden. Die Chromatogramme wurden mit einer wassergesättigten n-Butanol-Anilinphthalat-Lösung besprüht und 10 min bei 105° C im Trockenschrank entwickelt (Cramer 1954).

c) Stickstoffbestimmung. Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs wurden 10 mg des gefriergetrockneten Materials abgewogen. Die Proben wurden 45 min lang mit 1 cm^3 konz. H_2SO_4 und einer Spatelspitze Selenreaktionsgemisch (Merck) verascht, anschließend in der üblichen Weise destilliert und titriert.

Der lösliche Stickstoff wurde aus dem 5%igen Trichloressigsäure-Auszug bestimmt. 100 mg Trockensubstanz wurden mit 5 cm^3 siedender Trichloressigsäure 10 min lang extrahiert; 1 cm^3 dieses Auszuges diente zur Analyse.

Die durch die Kjeldahl-Bestimmungen erhaltenen Stickstoffwerte wurden auf das Trockengewicht bezogen (s. o.).

d) Papierchromatographische Analyse der Aminosäuren. Für die papierchromatographische Analyse stand Material der Gefriertrocknung zur Verfügung. Bei der Aufarbeitung wurden 2 g Trockensubstanz mit 300 cm^3 80%igem Alkohol extrahiert. Der gewonnene Extrakt wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung am Wasserstrahlvakuum (bei Zimmertemperatur) auf 10 cm^3 eingeengt. Zur chromatographischen Analyse dienten 20 mm^3 Konzentrat, die am Startpunkt aufgetragen wurden. Als Lösungsmittelgemisch wurde sek.-Butanol-Ameisensäure-Wasser (75:13:12) verwendet (Turba 1954). Bei zweidimensionalen Trennungen wurde gepuffertes Phenol (Citrat-Phosphat-Puffer nach Turba 1954) hinzugenommen. Nach der Trennung wurden die Chromatogramme mit Ninhydrin (in 95%igem Äthanol) besprüht und für 24 Std bei Zimmertemperatur entwickelt. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte an Hand der zweidimensionalen Chromatogramme (Bogengröße 29×30 cm), die auch Aufschluß über die Konzentrationsänderungen der einzelnen Aminosäuren im Laufe der Nachreife ergaben. Photographische Aufnahmen wurden jeweils 24 Std nach dem Besprühen der Chromatogramme (im Auflicht) angefertigt.

6. Infiltration von Fermentgiften und sonstigen Substanzen. Diese Untersuchungen gehören nur anhangsweise in den Rahmen der vorliegenden Arbeit. Es wurden nicht die einzelnen Stadien der Nachreife untersucht, sondern es wurde lediglich geprüft, inwieweit sich zu einem willkürlich herausgegriffenen Zeitpunkt die Keimrate beeinflussen läßt. Die Infiltration von Atmungssubstraten und Enzymgiften gibt uns aber die Möglichkeit, die Reaktionsbedingungen festzulegen, unter denen die Brutknospe überhaupt zur Keimung befähigt ist.

Die Vakuuminfiltration wäßriger Lösungen verändert die Reaktionsbedingungen schon dadurch, daß durch sie die Wasserbilanz der Zellen verändert wird. Dieser Nachteil könnte vielleicht dadurch beseitigt werden, daß die Infiltration in einem nichtpermeierenden isotonischen Lösungsmittel vorgenommen würde. Obwohl durch die Infiltrationsmethode alle Zeichen und Gewebspartien gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt sind (MOTHES 1933), muß außerdem berücksichtigt werden, daß neben der veränderten Wasserbilanz der Zellen der Gasaustausch stark beeinflußt wird. So tritt nach der Infiltration von Wasser ein erhöhter Sauerstoffverbrauch auf. Die vorliegenden Meßresultate dürfen jedenfalls nicht auf die Werte für normale Brutknospen bezogen werden, sondern nur auf Knospen, die mit destilliertem Wasser infiltriert wurden.

Die Lösungen der Fermentgifte und sonstigen Substanzen wurden 20 min bei einem Druck von 70 Torr infiltriert. Als Keimboden diente mit Quellwasser angefeuchtetes Filtrierpapier. Die Versuchsdauer erstreckte sich über 20 Tage.

Ergebnisse.

Verlauf der Nachreife.

Veränderungen der Keimbereitschaft lassen sich durch die Ermittlung der Keimprozente im Laufe der Nachreife erfassen (Abb. 1).

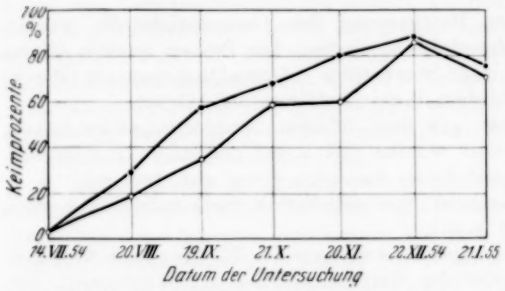


Abb. 1. Zunahme der Keimbereitschaft im Verlaufe der Nachreife. ·——· Dunkelkeimung; ○——○ Lichtkeimung.

Die Periode tiefster Ruhe erstreckt sich vom Zeitpunkt der Ernte bis gegen Mitte Juli. Erst zu diesem Zeitpunkt setzt die Keimung der ersten Brutknospen ein. Die Keimbereitschaft steigt dann bis zu ihrem Maximum Mitte Dezember beständig. Schon im Januar erlischt bei einer großen Anzahl von Brutknospen die Keimkraft. Nach dem Einbringen ins Keimbett verschimmeln sie; im Verlaufe der nächsten 4 Wochen tritt die Verpilzung in der relativ trockenen Atmosphäre des Thermostaten ein, so daß Mitte Februar kein keimfähiges Material mehr vorhanden war. Diese Beobachtung wurde auch im ersten Jahr der Versuchsanstellung gemacht. Sie könnte dafür sprechen, daß die Brutknospen während ihrer Nachreife gegen Pilzinfektionen geschützt sind.

Die Veränderungen der Keimbereitschaft stimmen in Licht- und Dunkelversuchen im wesentlichen überein, jedoch liegen die Absolutwerte der Keimraten unter Lichtabschluß stets etwas höher. Die Brutknospen keimen also bevorzugt im Dunkeln. Das sagt natürlich nichts aus über eine eventuelle — im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersuchte — Lichtabhängigkeit der Nachreifeprozesse. Diese ließe sich nur durch Lagerung der Bulbillen unter verschiedenen Lichtbedingungen erfassen.

Physikochemische Veränderungen während der Nachreife.

Bis zum Zeitpunkt der Ernte stehen die Brutknospen durch das Leitbündelsystem mit der Mutterpflanze in Verbindung. Bei ihrer Ernte sind sie turgeszent. Unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen ändert sich

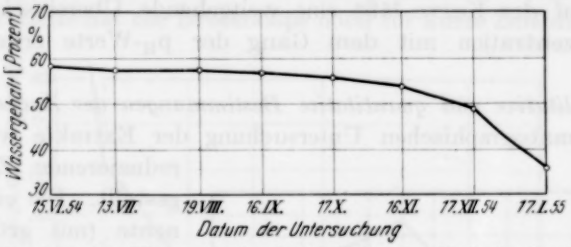


Abb. 2. Abnahme des Wassergehalts der Bulbillen im Verlaufe der Nachreife.

der *Wassergehalt* bis Mitte November nur recht wenig (Abb. 2), dann aber tritt eine erhebliche Abnahme des Frischgewichtes ein. Bis zur abschließenden Messung Mitte Januar ist ein deutlicher Wasserverlust meßbar.

Die *Wasserstoffionenkonzentration* der Pflanzenextrakte variiert im Laufe der Nachreifeperiode beträchtlich, wobei die Änderungen aber nicht kontinuierlich verlaufen (vgl. Abb. 3). Innerhalb der Periode tiefster Ruhe — vom Erntezeitpunkt bis Anfang August — ist ein erhebliches Absinken der Wasserstoffionenkonzentration meßbar, im Anschluß daran ein Wiederanstieg bis zum Zeitpunkt maximaler Keimbereitschaft im November und Dezember. Vom Dezember bis Mitte Januar erfolgt dann eine erneute Zunahme der p_H-Werte. Der in der Abb. 3 wiedergegebene Kurvenverlauf ist als statistisch gesichert zu betrachten.

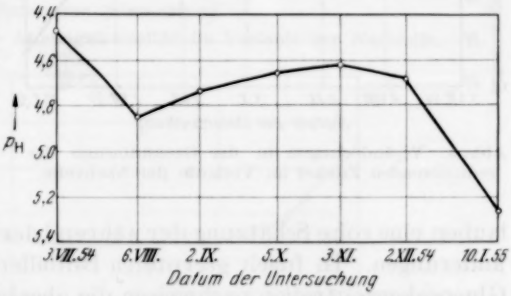


Abb. 3. Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration des Bulbillen-Konzentrats im Verlaufe der Nachreife.

Mit Wasser (1:1) verdünnte Extrakte zeigen nur sehr wenig abweichende p_H-Werte ($\triangle < 0{,}1$); die gemessenen Auszüge müssen demnach stark gepuffert sein.

Kontrollmessungen an *gekeimten* Brutknospen ließen — 15 Tage nach Keimungsbeginn — eine recht hohe Acidität erkennen, die den zur Zeit der tiefsten Ruhe gemessenen Werten etwa entsprach.

Chemische Veränderungen während der Nachreife.

a) Quantitative Analyse der reduzierenden Zucker. Da die Naphthoresorcinprobe auf nichtreduzierende Zucker (Cramer 1954) negativ

blieb, kann geschlossen werden, daß Rohrzucker als Inhaltsstoff der Bulbillen keine Rolle spielt. Es wurden daher ausschließlich die reduzierenden Zucker untersucht. Ihre Gesamtmenge (bestimmt nach HAGEDORN-JENSEN, s. o.) ist starken Änderungen unterworfen (Abb. 4). Der Verlauf der Kurve läßt eine weitgehende Übereinstimmung der Zuckerkonzentration mit dem Gang der p_H-Werte erkennen (vgl. Abb. 3).

b) Qualitative und quantitative Bestimmungen der Zucker. Bei der papierchromatographischen Untersuchung der Extrakte wurden zwei reduzierende Zucker festgestellt. Die eine Komponente (mit größerem R_F-Wert und erheblich höherer Konzentration) wurde mit Sicherheit als Glucose erkannt. Der zweite Zucker konnte noch nicht identifiziert werden. Sicherlich ist er nicht identisch mit Saccharose, Lactose, Maltose, Fructose, Xylose, Arabinose, Galactose, Sorbose, Rhamnose, Raffinose, Ribose und Mannose.

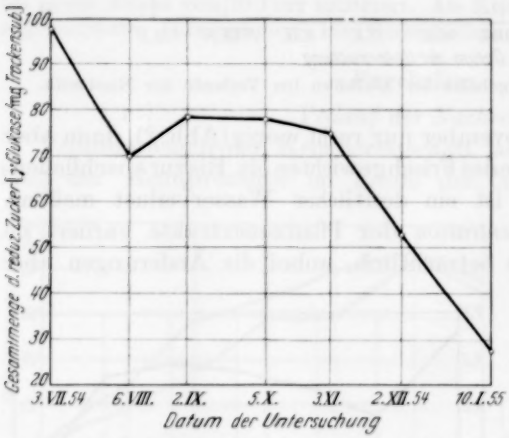


Abb. 4. Veränderungen in der Gesamtmenge der reduzierenden Zucker im Verlaufe der Nachreife.

Die eindimensionalen Papierchromatogramme erlauben eine rohe Schätzung der während der Nachreife ablaufenden Veränderungen. In frisch geernteten Bulbillen läßt sich eine relativ hohe Glucosekonzentration nachweisen, die aber bis zum August zu einem Minimum absinkt. Im Anschluß daran erfolgt eine erneute Zunahme der Konzentration, der im November bis zum Januar eine erhebliche Abnahme folgt. Die Glucosekonzentration in gekeimten Brutknospen (15. Tag nach Keimungsbeginn) ist sehr hoch, jedenfalls größer als in allen Extrakten ungekeimter Bulbillen.

Die zweite — nichtidentifizierte — Komponente sinkt in ihrer Konzentration ständig ab. In gekeimten Brutknospen tritt sie dann aber wieder deutlich in Erscheinung.

Gaswechsel.

Die *Atmungsintensität* der *Dentaria*-Bulbillen liegt unmittelbar nach der Ernte so hoch, daß in der graphischen Darstellung (Abb. 5) die Anfangswerte (Juni-Messungen) nicht eingezeichnet werden konnten. Sie betragen am 14. Juni 1990, am 17. Juni noch 1429 (mm^3 O_2-Ver-

brauch/100 min · 10 g Trockengewicht). Es ist zu bedenken, daß die heranreifende Brutknospe in der Achsel eines Blattes sitzt (ASELMANN 1910) und sich ihre Stoffwechselprozesse somit von denen der Mutterpflanze nicht wesentlich unterscheiden dürften. Nach der Trennung bei der Reife hat die Brutknospe noch für kurze Zeit die Möglich-

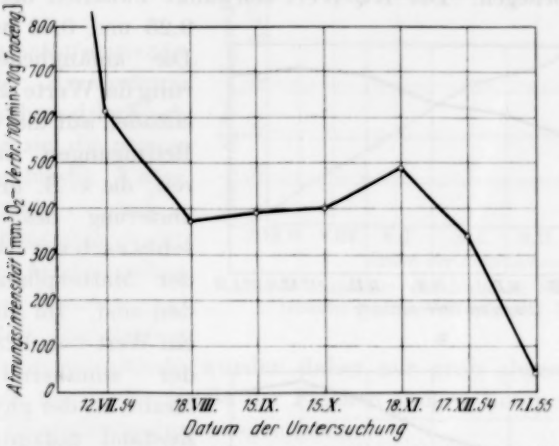


Abb. 5. Veränderungen der Atmungsintensität im Verlaufe der Nachreife.

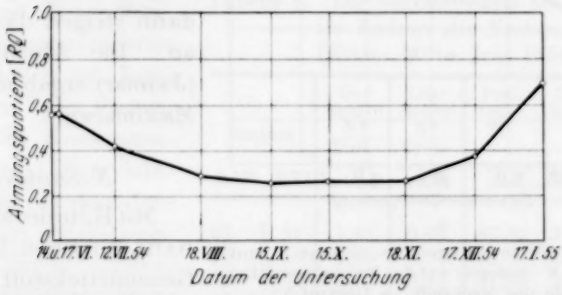


Abb. 6. Veränderungen des Atmungsquotienten im Verlaufe der Nachreife.

keit, intensiv zu atmen, da die dafür erforderlichen Atmungssubstrate noch in reichlicher Menge zur Verfügung stehen. Die in allen Zellen reichlich angehäufte Reservestärke braucht dafür vorerst nicht durch enzymatische Hydrolyse angegriffen zu werden. Mitte August erreicht die Atmungsintensität dann ein erstes Minimum. Hiermit endet die Periode tiefster Ruhe der Brutknospen. Schon 4 Wochen später macht sich ein Wiederanstieg der Atmung bemerkbar, der Mitte November einen Maximalwert erreicht. Der Zeitabschnitt, in dem in der Brutknospe der Einfluß des Stoffwechselgeschehens der Mutterpflanze nachwirkt, ist ein Übergangsstadium nach der Trennung. Erst danach ist sie als selbständiges Individuum anzusehen, das mit Hilfe seiner

Reservestoffe seinen eigenen Haushalt bestreitet. Nach dem Erreichen des Maximalwertes der Keimrate sinkt die Intensität des Gaswechsels relativ rasch ab.

Der *Atmungsquotient* weicht während der gesamten Nachreife erheblich von 1 ab; demnach kann keine Glucoseveratmung bis zur Stufe des CO_2 vorliegen. Der RQ-Wert schwankt zwischen den Extremen 0,25 und 0,69 (vgl. Abb. 6). Die anfängliche Verringerung der Werte ist unter Umständen auf die veränderten Bedingungen zurückzuführen, die z. B. mit der Veränderung des Gasaustausches nach der Abnahme von der Mutterpflanze verbunden sind. Im August wurde ein Wert von 0,28 gemessen, der annähernd konstant bleibt, bis der physiologische Zustand maximaler Keimbereitschaft erreicht ist. Erst dann steigen die RQ-Werte an. Die Abschlußmessung (Januar) ergab mit 0,69 den Maximalwert.

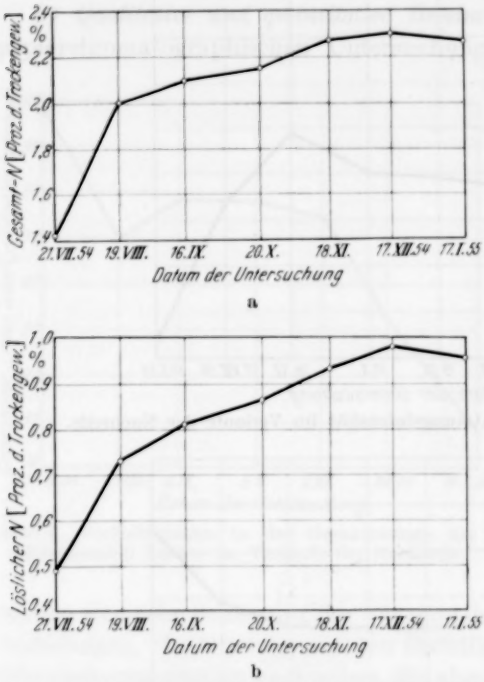


Abb. 7a u. b. Veränderungen des Gesamt-N und des löslichen N (bezogen auf das Trockengewicht) im Verlaufe der Nachreife. a Gesamt-N; b löslicher N.

N-Stoffwechsel.

Mit Hilfe der Mikro-KJELDAHL-Analysen konnten der Gesamtstickstoff und die Menge des löslichen Stickstoffs ermittelt werden. Die Meßwerte wurden auf das Trockengewicht bezogen. Sie ermöglichen einen Einblick in die *Veränderungen des Mengenverhältnisses der Stickstoffverbindungen zu den Kohlenstoffverbindungen*. Der Gesamtstickstoff und der Gehalt an löslichen Stickstoffverbindungen nehmen, bezogen auf das Trockengewicht, im Laufe der Nachreife zu (vgl. Abbildung 7a und b).

Die Zunahme des Gesamt-N ist jedoch nur scheinbar. Sie erklärt sich durch die Veratmung von Kohlenstoffverbindungen, wodurch der Anteil der Kohlenhydrate an der gesamten Trockensubstanz zugunsten der Stickstoffverbindungen absinkt.

Die Veränderungen des löslichen N, bezogen auf das Trockengewicht, sind zum Teil durch die gleichen Ursachen bedingt. Neben der Veränderung des C:N-Verhältnisses erfolgt aber eine zusätzliche *Vermehrung von löslichen N-Verbindungen auf Kosten des Protein-N* (Abb. 8; vgl. Tabelle 1). Die Gründe für den Eintritt dieser Hydrolyse sind uns noch unbekannt.

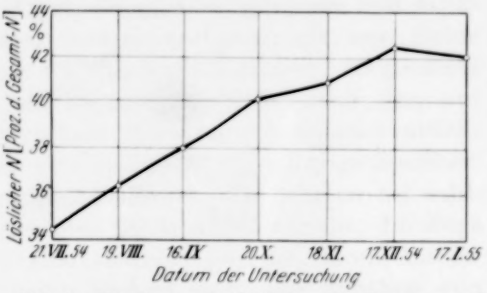


Abb. 8. Zunahme des löslichen N (bezogen auf Gesamt-N) im Verlaufe der Nachreife.

Die *Konzentrationsveränderungen der Aminosäuren und Amide* während der Nachreife — wie sie die papierchromatographische Untersuchung ergibt — sind so deutlich, daß sie ohne exakte quantitative Analyse abgelesen werden konnten (vgl. Abb. 9a und b). Die relativen Konzentrationsunterschiede wurden daher nur grob abgeschätzt. Zu diesem Zweck wurde die Größe der Flecken einiger Komponenten mit Hilfe eines Polarplanimeters ausgemessen.

Tabelle 1. *Die Stickstoffbilanz der Brutknospen im Verlaufe der Nachreife.* (Ernte: Mitte Juni 1954).

Datum	Gesamt-N* / Trockengewicht	Löslicher N* / Trockengewicht	Protein-N* (bezogen auf Gesamt-N)	Löslicher N* (bezogen auf Gesamt-N)	Löslicher N / Protein-N
21. 7. 54	1,42	0,49	65,64	34,36	0,52
19. 8. 54	2,03	0,74	63,70	36,30	0,57
16. 9. 54	2,12	0,81	61,96	38,04	0,61
20. 10. 54	2,16	0,87	59,82	40,18	0,67
18. 11. 54	2,28	0,93	59,08	40,92	0,69
17. 12. 54	2,31	0,98	57,54	42,46	0,74
17. 1. 55	2,27	0,96	57,90	42,10	0,73

* Angaben in Prozent.

Bis zum Erreichen der Keimfähigkeit (November, Dezember) nahmen in ihren Konzentrationen zu: Leucin/Isoleucin, Valin (besonders deutliche Konzentrationszunahme), Phenylalanin, Prolin (besonders deutliche Konzentrationszunahme), Serin, Cystin/Cystein (deutlichste überhaupt beobachtete Konzentrationszunahme), Arginin. Bei der γ-Aminobuttersäure, dem β-Alanin und dem Threonin sind keine Konzentrationsveränderungen zu erkennen. Beim Histidin ist die Zunahme, wenn überhaupt vorhanden, nur sehr gering. In erstaunlich hoher Konzentration ist die Glutaminsäure vorhanden; ebenso wie die gleichfalls nachgewiesene Asparaginsäure steht sie im lebhaften Austausch mit mehreren anderen Aminosäuren (Lehnartz 1952). Glutaminsäure und Asparaginsäure kommt anscheinend im Intermediärstoffwechsel eine zentrale Bedeutung für Aminierung und

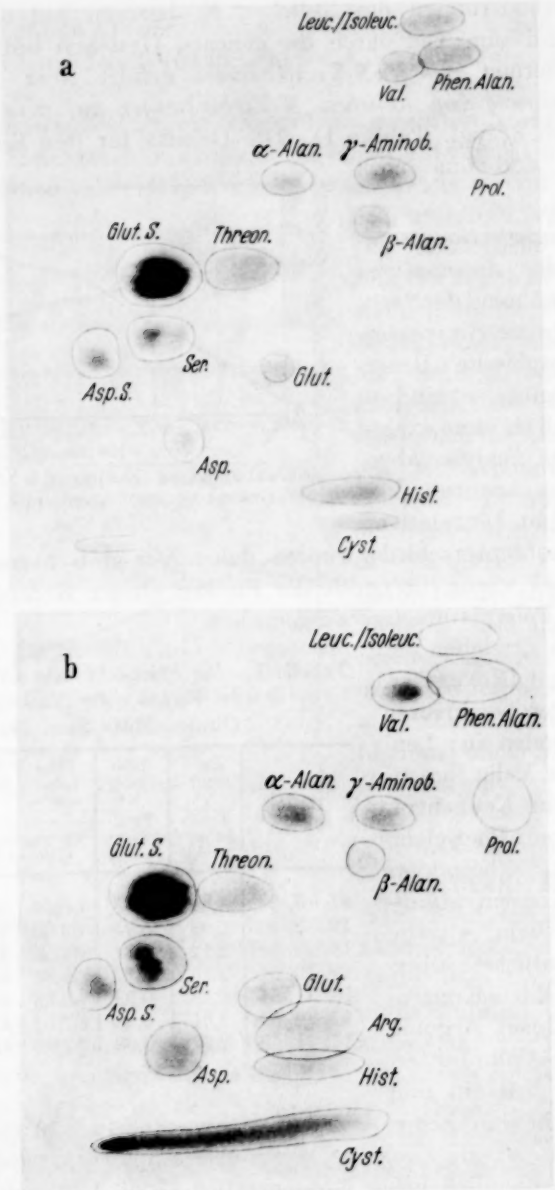


Abb. 9a u b. Zweidimensionale Papierchromatogramme der ninhydrinpositiven Substanzen des Bulbillen-Extrakts. a Anfangsstadium der Nachreife (21. 7. 54); b Endstadium der Nachreife (18. 11. 54).

Umaminierung zu. Über ihre α-Ketosäuren haben sie neben dem α-Alanin eine unmittelbare Beziehung zum Citronensäurecyclus.

Das α-Alanin verhält sich abweichend. Bis zur Schlußmessung (Januar) steigt seine Konzentration an, während alle anderen Aminosäuren von November bzw. Dezember bis zum Januar in ihrer Konzentration mehr oder weniger deutlich absinken. Hier mag eine Transaminierung vorliegen.

Neben den entsprechenden Aminosäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure, kommen deren Amide, Glutamin und Asparagin, vor. Beide Komponenten verhalten sich wie die zugehörigen Säuren. In größerer Menge vorhanden, stellen sie ein bedeutendes N-Reservoir dar, auf das die Pflanze bei der Proteinsynthese (Keimung von Samen) zurückgreift. Die beiden Verbindungen sind aber nicht nur wichtige Speicher, sondern auch Transportformen des Stickstoffs. Sie nehmen bei zahlreichen physiologischen Prozessen eine Schlüsselstellung ein. Im Zuge von Transaminierungsprozessen sind sie dazu geeignet, ihren Aminostickstoff auf Ketosäuren zu übertragen und so bei der Synthese von Aminosäuren mitzuwirken (Reuter und Wolffgang 1954).

Neben der Analyse der verschiedenen Nachreifestadien sind, wie schon erwähnt, auch bei *gekeimten* Brutknospen Untersuchungen über den Gehalt an Aminosäuren und Amiden angestellt worden. Der Vergleich zweier Keimungsstadien zeigt, daß im ersten Stadium der Keimung ein Teil der Aminosäuren verbraucht wird, die im weiteren Verlauf der Keimung intensiv neu gebildet werden. Am 15. Tage nach dem Keimungsbeginn treten Glutamin, Asparagin, Asparaginsäure und Arginin deutlich hervor.

Künstliche Beeinflussung der Keimung.

Die Untersuchungen über die Keimrate der Brutknospen nach Infiltration von *Brenztraubensäure* und *Glucose* wurden unmittelbar zu Beginn der Ruheperiode angestellt. Die angewandten Konzentrationen betrugen $5 \cdot 10^{-1}$, $4 \cdot 10^{-1}$, $3 \cdot 10^{-1}$, $2 \cdot 10^{-1}$, 10^{-1} und $9 \cdot 10^{-2}$ Mol/l. Beide Substanzen bewirkten eine eindeutige Vermehrung der Keimrate bei gleichzeitiger Erhöhung der Keimschnelligkeit. Bei der Infiltration von Brenztraubensäure stieg die Keimrate auf 300—400% der Wasserkontrolle, nach der Infiltration von Glucose auf rund 200%.

Die *frühtreibende Wirkung der Glucose* und insbesondere der Brenztraubensäure ist allgemein bekannt (vgl. Bünning 1953). Die *Entwicklungsanregung durch die Brenztraubensäure* wird durch deren zentrale Stellung im intermediären Stoffwechsel verständlich. Die Möglichkeit, die Keimrate noch ruhender Bulbillen beträchtlich zu erhöhen, beweist, daß den Kohlenhydratreserven der Brutknospen, insbesondere aber den Intermediärprodukten der Atmung, eine erhebliche Bedeutung zukommt.

Beeinflussung der Keimung durch Fermentgifte.

a) 2,4-Dinitrophenol, Jodessigsäure. 2,4-Dinitrophenol verändert schon in geringer Konzentration die Atmungsintensität; in geringer Dosis geboten, bewirkt es offenbar eine Steigerung des gesamten Stoffwechsels. Diese ist allerdings zugunsten der Dissimilation verschoben; der „synthetische Wirkungsgrad" (KANDLER 1950) der Zelle ist herabgesetzt. Da 2,4-Dinitrophenol die Winterruhe der Bäume um etwa 14 Tage verkürzt, scheint es fraglich, ob die Wirkung allein als „Entkoppelung" von Dehydrierung und Phosphorylierung (KANDLER 1950) erklärt werden kann.

Jodessigsäure verbindet sich mit SH-Gruppen und vermag daher alle Wirkstoffe mit Thiolgruppen (z. B. Triosephosphatdehydrase, Äpfelsäuredehydrase und

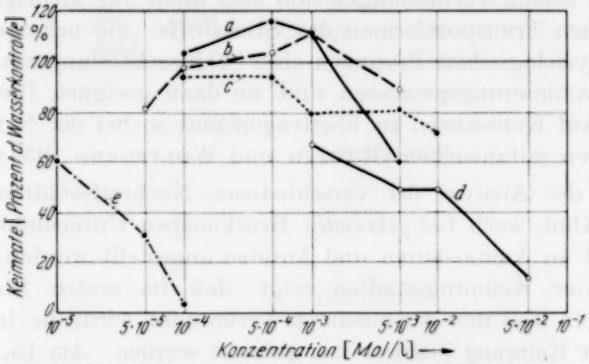


Abb. 10. Fermentgift-Wirkungen auf die Keimung der Brutknospen. Kurve a Jodessigsäure; b 2,4-Dinitrophenol; c Natriumfluorid; d Malonsäure; e Malachitgrün.

Coenzym A) zu hemmen (THIMANN und BONNER 1948, BARRON 1951). Die Herabsetzung der Atmungsintensität ist an Stengelschnitten der Tomate untersucht worden (LATIES 1949). Der Wirkungsgrad der Jodessigsäure ist p_H-abhängig.

Beide Fermentgifte führen, wenn die Konzentrationen tiefer als 10^{-3} Mol/l liegen, zu einer geringen Förderung oder doch zu keiner wesentlichen Hemmung gegenüber der Wasserkontrolle. Erst Jodessigsäure- und Dinitrophenolkonzentrationen von mehr als $5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l wirken ausgesprochen hemmend (vgl. Abb. 10).

Nach der Infiltration von Jodessigsäure tritt eine auffallend starke Beeinflussung der Atmung und des Atmungsquotienten ein. Der Sauerstoffverbrauch wird verdoppelt, der RQ hat einen Wert von 0,65. Auch 2,4-Dinitrophenol zeigt mit zunehmender Konzentration einen steigenden O_2-Verbrauch. Der RQ schwankt dabei zwischen Werten von 0,45 und 0,55.

b) Malonsäure, Natriumfluorid und Malachitgrün. Die Malonsäure ist — möglicherweise infolge ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit der Bernsteinsäure — ein spez. Hemmstoff der Bernsteinsäuredehydrase (LATIES 1949); der Grad der Hemmung ist p_H-abhängig. Spinatblätter lassen bei der Behandlung mit Malonsäure

eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme erkennen (LATIES 1949), doch scheint diese Beobachtung nicht verallgemeinert werden zu dürfen.

Auch Malachitgrün und Natriumfluorid sind wirksame Atmungsinhibitoren. Malachitgrün soll eine unspezifische Hemmung aller Dehydrasen bewirken (CALDWELL u. MEIKLEJOHN 1937). Schon bei niederen Konzentrationen führt es zu einer erheblichen Hemmung der O_2-Aufnahme.

Alle drei Fermentgifte verzögern die Keimung von Brutknospen (s. Abb. 10). Am ausgeprägtesten tritt dies bei Malachitgrün hervor, das noch bis herab zu Konzentrationen von 10^{-5} Mol/l hemmend wirkt. Einen gleichen Hemmeffekt zeigt die Malonsäure im Konzentrationsbereich von 10^{-1} bis 10^{-3} Mol/l. Natriumfluorid ist weniger wirksam. Eine Förderung der Keimrate wurde für keines dieser Enzymgifte beobachtet.

Ausgesprochen fördernd wirkt die Malonsäure auf den Gesamtsauerstoffverbrauch, der anfangs den dreifachen Wert der Wasserkontrolle hat. Der Atmungsquotient wird bei höheren Konzentrationen auf Werte über 1 erhöht.

Zuverlässigkeit der Meßergebnisse.

Die Streuung der Meßwerte ist sehr gering, so daß der Verlauf der im experimentellen Teil wiedergegebenen Kurven — bis auf vereinzelte Kurvenabschnitte — als (nach PÄTAU 1943) statistisch gesichert zu betrachten ist. Größere Schwankungen traten nur bei der Auszählung der Keimprozente nach Infiltration von Brenztraubensäure und Glucose auf. Hier wurde daher auch auf die Wiedergabe der genauen Zahlenangabe verzichtet und statt dessen die durchschnittliche Förderung in Prozent der Wasserkontrolle (s. oben) angeführt.

Diskussion.

Obwohl sich an Hand der vorliegenden Versuchsergebnisse vielfach *Parallelen zwischen den Nachreifevorgängen von Dentaria-Brutknospen und denen von Samen* aufzeigen lassen, ist dennoch ein grundlegender Unterschied hervorzuheben: Während die frisch geerntete Brutknospe einen hohen Wassergehalt aufweist, der im Laufe der Nachreife allmählich absinkt, erklärt sich das Nachreifebedürfnis von Samen zum Teil aus der Notwendigkeit, eine bestimmte Wassermenge aufnehmen zu müssen (s. oben). Dieser wesentliche Unterschied im Wasserhaushalt ist sicherlich für die stofflichen Veränderungen bei den untersuchten Nachreifeprozessen von großer Bedeutung.

Eine Parallelität in den Veränderungen von Wassergehalt und Gasaustausch konnte bei *Dentaria*-Brutknospen erst nach Abschluß ihrer Nachreife gezeigt werden. Nach Erreichen des Keimmaximums nehmen Wassergehalt und Atmungsintensität gleichsinnig ab.

Die Nachreife läßt sich in zwei Phasen unterteilen, die sich in der Atmungsintensität, im p_H-Wert der Konzentrate und im Zuckergehalt der Brutknospen nachweisen lassen. Diese Erscheinung dürfte aus der Bereitstellung des Atmungsmaterials zu erklären sein: In der ersten Phase leben die Brutknospen von den von der Mutterpflanze mitgegebenen löslichen Kohlenhydratreserven; nach deren Verbrauch setzt eine zweite Phase mit einer enzymatischen Bereitstellung neuen Atmungsmaterials ein. Dadurch wird ein erneuter Anstieg der Atmung möglich, bis schließlich nach Abschluß der Nachreifeperiode die Intensität auf ein Minimum reduziert wird. Die Brutknospen atmen also unter den gegebenen Bedingungen so lange intensiv, bis sie ihre Ruheperiode annähernd abgeschlossen haben.

In diesem Zusammenhang sind die Nachreifestudien von VALLANCE (1950, 1951) an Samen von *Striga hermonthica* von Interesse. VALLANCE hält die Bildung keimungsauslösender Stoffe für erforderlich; diese sollen nach seiner Ansicht im Zuge der Atmung bereitgestellt werden. Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Stellungnahme zur VALLANCEschen Annahme erlauben, so dürfte doch feststehen, daß dem Atmungsgeschehen eine erhebliche Bedeutung beim Ablauf der Nachreifeprozesse zukommt.

Es ist besonders darauf hinzuweisen, daß die *Atmung der Bulbillen keine vollständige Oxydation von Glucose* darstellt. Der Atmungsquotient müßte bei der vollständigen Verbrennung von Glucose (nach der Formel $C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$) 1 betragen. Dieser Wert ist zu keinem Zeitpunkt gemessen worden. Es kann sich daher bei der Veratmung von Kohlenhydraten im Verlaufe der Nachreife der *Dentaria*-Brutknospen nur um eine unvollständige Dissimilation handeln. Dieser laufen wahrscheinlich Synthesen im Sinne der WOOD-WERKMAN-Reaktion parallel.

Im Zusammenhang mit den besprochenen Untersuchungen des Kohlenhydratstoffwechsels interessierte ebenfalls *Art und Menge der löslichen Atmungssubstrate*. An Hand der qualitativen und quantitativen Zuckeranalysen erscheint eine unmittelbare Beziehung der Atmungsintensität zur Glucosekonzentration wahrscheinlich. Mit Sicherheit ist anzunehmen, daß Säuren nicht in nennenswertem Umfange als Atmungssubstrate dienen; andernfalls müßte der RQ erheblich höher liegen. Die Bildung organischer Säuren ist nicht im einzelnen untersucht worden, würde aber sicherlich wertvolle Einblicke in den Stoffwechsel nachreifender Ruheorgane bringen können.

Bei einem Vergleich der einzelnen untersuchten Stoffwechseländerungen dürfen wir nicht in den Fehler verfallen, aus einer Parallelität auf einen Kausalzusammenhang zu schließen. Erst weitere Arbeiten

werden also klären können, inwieweit die beobachteten Einzelprozesse wirklich ineinandergreifen und inwieweit sie lediglich nebeneinander verlaufen.

Zusammenfassung.

Die Nachreifeprozesse der Brutknospen von *Dentaria bulbifera* wurden mit Hilfe physiologischer und biochemisch-analytischer Methoden untersucht. Dabei konnte eine Reihe charakteristischer Veränderungen festgestellt werden:

Unter Laboratoriumsbedingungen wurde das Maximum der Keimfähigkeit nach einer Aufbewahrungszeit von 6 Monaten erreicht.

Im Gegensatz zu Samen, die in der Periode der Ruhe einen geringen Wassergehalt aufweisen, sind die Brutknospen nach der Ernte turgeszent. Ihr Wassergehalt verringert sich erst dann merklich, wenn ihre Nachreife annähernd abgeschlossen ist.

Die Atmungsintensität, die erst am Ende der Nachreife eine unmittelbare Beziehung zum Wassergehalt aufweist, läßt einen Ablauf der Nachreife in zwei Phasen erkennen. Diese spiegeln sich in den Veränderungen der Zuckerkonzentration sowie der Wasserstoffionenkonzentration wider. Auch die Untersuchungen über den respiratorischen Quotienten lassen eine Beziehung zu den Nachreifeprozessen erkennen.

Die Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration von Bulbillen-Extrakten zeigen eine deutliche Beziehung zum O_2-Verbrauch. Einen ebenso deutlichen Zusammenhang mit der gemessenen Atmungsintensität weist die Glucosekonzentration und bis zu einem gewissen Grade auch die Gesamtmenge der reduzierenden Zucker auf. Obwohl die gemessenen RQ-Werte von 1 verschieden sind, wird dies dennoch als Hinweis dafür gewertet, daß Glucose als Atmungsmaterial in Frage kommt. Allerdings liegt sicherlich keine Oxydation bis zur Stufe des CO_2 vor.

Die Infiltration von Fermentgiften führt bei Malachitgrün, Malonsäure und Natriumfluorid zu einer deutlichen Hemmung von Keimzahl und Keimgeschwindigkeit. 2,4-Dinitrophenol und Jodessigsäure wirken umgekehrt in geringer Konzentration fördernd. Besonders deutliche Förderungen ergeben infiltrierte Glucose und Brenztraubensäure.

Das C:N-Verhältnis der Trockensubstanz verschiebt sich im Verlaufe der Nachreife zugunsten des Stickstoffs. Nebenher läuft eine Konzentrationszunahme der löslichen N-Verbindungen auf Kosten der Proteine.

Die ninhydrin-positiven Substanzen der alkoholischen Bulbillen-Extrakte wurden papierchromatographisch getrennt und identifiziert. Die Konzentrationsverschiebungen der einzelnen Komponenten im Verlaufe der Nachreife wurden ermittelt.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1952—1955 im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen ausgeführt. Herrn Professor Dr. R. HARDER möchte ich für die Anregung zu diesen Untersuchungen und für das Interesse, das er ihnen entgegenbrachte, herzlich danken. Zu ganz besonderem Dank bin ich Herrn Privatdozent Dr. METZNER für seine weitgehende Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Versuche verpflichtet.

Literatur.

ASELMANN, W.: Beiträge zur Biologie der Wurzelknollen von *Ranunculus ficaria* und der Bulbillen von *Dentaria bulbifera*, *Lilium bulbiferum* und *Saxifraga granulata*. Diss. Philosoph. Fak. Kiel 1910. — BARTON, L. V., and M. L. SOLT: Growth inhibitors in seeds. Contrib. Boyce Thompson Inst. **15**, 259 (1948). — BARRON, E. S. G.: Thiol groups of biological importance. Adv. Enzymol. **11**, 201 (1951). — BÜNNING, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953. — BÜNNING, E., u. E. W. BAUER: Über die Ursachen endogener Keimfähigkeitsschwankungen. Z. Bot. **40**, 67 (1952). — CALDWELL, J., and J. MEIKLEJOHN: Observations on the oxygen uptake of isolated plant tissue. The effect of inhibitors. Ann. of Bot., N.S. **1**, 487 (1937). — CRAMER, F.: Papierchromatographie, 2. Aufl. Weinheim 1954. — ECKERSON, S.: A physiological and chemical study of afterripening. Bot. Gaz. **55**, 286 (1913). — HAGEDORN, H. C., u. B. N. JENSEN: Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. Biochem. Z. **135**, 46 (1923). — HEMBERG, T.: Studies of auxins and growth-inhibiting substances in the potato tuber and their significance with regard to its rest-period. Acta horti bergiani **14**, 326 (1947). — The significance of the acid growth-inhibiting substances for the rest-period of potato tuber. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 115 (1952). — JOHANNSEN, W.: Das Ätherverfahren beim Frühtreiben, 2. Aufl. Jena 1906. — KANDLER, O.: Über den Einfluß von 2,4-Dinitrophenol auf Atmung und Wachstum in vitro kultivierter Maiswurzeln. Z. Naturforsch. **5b**, 338 (1950). — LATIES, G. G.: The role of pyruvate in the aerobic respiration of barley roots. Arch. of Biochem. **20**, 284 (1949). — LEHNARTZ, E.: Chemische Physiologie, 10. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1952. — LOOMIS, W. E.: Growth and differentiation in plants. The Iowa State College Press 1949. — LUCKWILL, L. C.: Growth-inhibiting and growth-promoting substances in relation to the dormancy and after-ripening of apple seeds. J. Horticult. Sc.. **27**, 53 (1952). — MOTHES, K.: Die Vakuuminfiltration im Ernährungsversuch. Planta. (Berl.) **19**, 117 (1933). — PAECH, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1950. — PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Meßreihen. Biol. Zbl. **63**, 152 (1943). — REUTER, G., u. H. WOLFFGANG: Vergleichende Untersuchungen über den Charakter der Stickstoffverbindungen von Baumblutungssäften bei Betulaceen und anderen Holzarten. Flora (Jena) **142**, 146 (1954). — ROSE, R. C.: After-ripening and germination of seeds of *Tilia*, *Sambucus*, and *Rubus*. Bot. Gaz. **67**, 281 (1919). — RUGE, U.: Untersuchungen über keimungsfördernde Wirkstoffe. Planta (Berl.) **35**, 297 (1948). — RUGE, U., u. D. LIEDTKE: Zur photoperiodischen Keimbereitschaft einiger Malvenarten. Ber. dtsch. bot. Ges. **64**, 141, (1951). — STILES, W., and W. LEACH: Re-

spiration in Plants. London 1932. — TURBA, F.: Chromatographische Methoden in der Proteinchemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954. — THIMANN, K. V., and W. D. BONNER: Experiments on the growth and inhibition of isolated plant parts. I. The action of iodoacetate and organic acids on the *Avena* coleoptile. Amer. J. Bot. **35**, 271 (1948). — UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS, and J. E. STAUFFER: Manometric techniques in tissue metabolism, 2. Aufl. Minneapolis: Burgess Publ. Co. 1951. — VALLANCE, K. B.: Studies on the germination of the seeds of *Striga hermonthica*. The influence of moisture-treatment, stimulant-dilution, and after-ripening on germination. Ann. of Bot., N.S. **14**, 347 (1950). — Studies on the germination of the seeds of *Striga hermonthica*. On the nature of pretreatment and after-ripening. Ann. of Bot., N.S. **15**, 109 (1951). — WOLF, J.: Nichtflüchtige Mono-, Di- und Tricarbonsäuren. In K. PAECH u. M. V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 2. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.

Dr. BRUNO KÖNEMANN, Hartum/Krs. Minden i. Westf.

Planta, Bd. 46, S. 534—551 (1956).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen.

DIE BEEINFLUSSUNG DER KEIMUNG VON FARNSPOREN DURCH LICHT UND ANDERE FAKTOREN.

Von

HANS MOHR.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. November 1955).

1. Einleitung.

Die Abhängigkeit der Keimung von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes ist sowohl für lichtempfindliche Samen wie für Sporen schon öfters untersucht worden.

MEISCHKE (1936) und FLINT und MCALISTER (1935, 1937) zeigten, daß Spektralbereiche mit keimungshemmender und keimungsfördernder Wirkung über das Spektrum verteilt sind. RESÜHR (1939) hat die Arbeiten von MEISCHKE mit Erfolg weitergeführt.

Etwa gleichzeitig mit diesen Arbeiten über Samenkeimung erschien 1937 eine Arbeit von ORTH über Farnsporenkeimung und Protonemenwachstum, die sich an die vorausgegangenen Arbeiten von KLEBS (1917) und STEPHAN (1928) anschloß. Schon von KLEBS und STEPHAN war deutlich erkannt worden, daß die Lichtqualität für die Auslösung der Sporenkeimung und für das Wachstum der Protonemen entscheidend wichtig ist. Obgleich eine verschiedenartige Wirkung der kurz- und der langwelligen Strahlen von allen drei Forschern eindeutig festgestellt wurde, blieben in Einzelheiten Widersprüche zwischen den verschiedenen Arbeiten bestehen. Auch hat keiner der zitierten Autoren ein genaues Aktionsspektrum für die Sporenkeimung und für das Protonemenwachstum angegeben, wie es etwa FLINT und MCALISTER für die Samenkeimung vorgelegt haben. Dies dürfte seinen Grund vor allem in methodischen Schwierigkeiten haben, besonders darin, daß damals lediglich Gelatinefilter (STEPHAN) oder Farbgläser (KLEBS, ORTH) zur Verfügung standen, womit keine genügend engen Spektralbereiche hergestellt werden können.

Die vorliegende Arbeit wurde unternommen, um mit Hilfe von Interferenzfiltern, die relativ sehr enge Spektralbereiche isolieren, ein genaueres Aktionsspektrum der Sporenkeimung aufzustellen.

2. Das Material.

Für die Untersuchungen wurden Sporen von *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott verwendet, die sich als sehr günstig erwiesen haben.

Die Sporen wurden vom 4.—6. August 1954 im Botanischen Garten in Tübingen von einem sehr homogenen Bestand geerntet, sorgfältig gereinigt und bei etwa 8° C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Keimfähigkeit der Sporen hat sich in der Zwischenzeit nur wenig verändert. Beobachtete Schwankungen der Keimbereitschaft und der Lichtempfindlichkeit können wahrscheinlich auf geringfügige Verschiedenheiten der Substrate (Agar) zurückgeführt werden. Etwa 94% der Sporen sind gegenwärtig (August 1955) noch keimfähig.

In den Vorversuchen werden die Sporen physiologisch näher charakterisiert werden. Es sei jedoch sogleich festgestellt, daß unter den geprüften Bedingungen die Sporen obligate Lichtkeimer sind. Dunkelkeimungen wurden nicht beobachtet.

3. Methodik der Keimversuche.

a) Das Substrat der Keimung. Die Sporen wurden mit Hilfe eines feinen Pinsels möglichst homogen auf 2%igen Agar ausgesät. Da schon geringe Änderungen der Substratbedingungen einen wesentlichen Einfluß auf die Keimung haben können, wurde stets für alle zusammengehörigen Versuche derselbe Agar verwendet. Der Agar, der in der üblichen Weise hergestellt wurde und ohne jeden Zusatz blieb, wurde in einer 4—5 mm dicken Schicht in kleine Schälchen von 3 cm Durchmesser und 1 cm Höhe gegossen. Der p_H-Wert des Agars betrug 5,2—5,4. Auf die Schälchen wurden Glasdeckel oder die Filter gelegt und mit Wollfett abgedichtet. Abb. 1 zeigt die benutzte Anordnung.

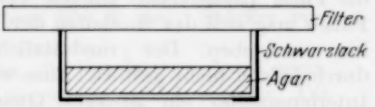


Abb. 1. Schema der Anordnung von Agar und Filter

b) Das abgeschlossene Luftvolumen. Den Sporen, die auf dem Agar keimen, steht nur ein abgeschlossenes Luftvolumen zur Verfügung. Vorversuche haben gezeigt, daß das beschränkte Luftvolumen für die Sporenkeimung vollständig ausreicht und sich nicht als begrenzender Faktor auswirkt. Das abgeschlossene Luftvolumen hat den großen Vorteil, daß die Luftfeuchtigkeit in der Schale konstant bleibt und daß der Agar kein Wasser verliert.

c) Die Filter. Es wurde im Spektralbereich von 400—1100 mμ untersucht. Benutzt wurden 26 Interferenzfilter der Firma Schott und Gen., Mainz, deren charakteristische Daten in der Tabelle 1 zusammengestellt sind.

Tabelle 1. *Die charakteristischen Daten der verwendeten Interferenzfilter.* (Nach den Angaben von Schott und Gen., Mainz).

λ_{Max} mμ	D_{Max} %	HW mμ	λ_{Max} mμ	D_{Max} %	HW mμ	λ_{Max} mμ	D_{Max} %	HW mμ
410	47	17	533	36	9,5	688	44	14
430	42	14	568	41	17	700	57	14
445	30	10	587	35	8	717	29	10
455	47	12	606	40	10	733	36	12
462	38	13	634	35	9	754	41	11
477	45	15	649	37	13	801	36	13
486	40	9	661	54	11	997	36	16
495	33	14	668	55	14	1100	30	17
510	27	11	679	33	10			

Es bedeuten: λ_{Max} Wellenlänge des Maximums der Durchlässigkeit; D_{Max} maximale Durchlässigkeit in Prozent; HW Halbwertsbreite.

d) Die Energiemessung. Die Messung der von den Filtern durchgelassenen Energie erfolgte mittels einer empfindlichen Thermosäule und mit dem Multiflexgalvanometer MGF 0 der Firma Lange, Berlin-Zehlendorf. Das System wurde mit Hilfe einer Eichlampe derselben Firma geeicht, und zwar indirekt. Zunächst

wurde eine weniger empfindliche, aber mit der Eichlampe leicht und genau eichbare Thermosäule (Silber-Konstantan), die ebenfalls von der Firma Lange stammt, geeicht. Mittels dieser genau geeichten Thermosäule erfolgte dann die Eichung der empfindlichen, für die Energiemessungen benutzten Thermosäule. Welcher Fehler bei der Eichung vorgekommen ist, kann nicht angegeben werden, da die Genauigkeit der Eichlampe nicht bekannt ist.

e) Die Lampen. Für die Bestrahlung von Interferenzfiltern ist nur paralleles Licht brauchbar. Die benützten Lampen wurden in der Werkstatt des Physikalischen Institutes Tübingen gebaut und liefern ziemlich genau paralleles Licht. Als Lichtquellen dienten Osram-Glühbirnen (30 W, 6 V).

f) Mögliche Fehlerquellen. Die Intensität unter den Filtern wird durch eine Änderung des Glühlampenstromes variiert. Schwankungen der Netzspannung spielen keine Rolle, da alle Versuche mit Benützung von Spannungskonstanthaltern (RUHSTRAT, Göttingen) durchgeführt wurden. Die Energieverteilung im Emissionsspektrum der Glühwendel bringt es nun mit sich, daß die Kurve der die Filter passierenden Energie etwas asymmetrisch wird, und in ungünstigen Fällen mag sich das Maximum der Durchlässigkeit geringfügig zum Langwelligen hin verschieben. Der grundsätzliche Verlauf des Wirkungsspektrums wird dadurch jedoch nicht gestört. Eine weitere Fehlerquelle entsteht dadurch, daß die Interferenzfilter ein gewisses Quantum „filterfremdes" Licht (außerhalb der 10tel Wertsbreite) durchlassen, dessen Intensität nach den Angaben von Schott und Gen. 5—10% des innerhalb der 10tel Wertsbreite durchgehenden Lichtes betragen kann. Dieses filterfremde Licht ist auf der langwelligen Seite etwas stärker als auf der kurzwelligen, was ebenfalls auf der Energieverteilung im Spektrum des Glühlampenlichtes beruht. Die Halbwertsbreite, die maximale Durchlässigkeit und die Intensität des Restlichtes ändern sich von Filter zu Filter. Je größer die Durchlässigkeit der Filter ist, um so größer wird der Fehler, der bei der Energiemessung durch das langwellige Restlicht entsteht. Um bei den Filtern mit höchster Durchlässigkeit (661 und 668 mμ) diesen Fehler zu verringern, wurden sie mit dem Schottschen Glasfilter BG 19 kombiniert. Bei den Filtern mit geringer Durchlässigkeit mußte der volle Fehler, der hier allerdings klein ist, in Kauf genommen werden. Für eine genaue thermoelektrische Energiemessung mit den zur Verfügung stehenden Hilfsmitteln konnte eine Intensität von 200 erg/cm^{2}sec nicht unterschritten werden. Diese Intensität liegt bei den Filtern mit geringer oder mittlerer Durchlässigkeit an der oberen Grenze der Leistungsfähigkeit der Lampen, besonders im kurzwelligen Bereich. Da jede Kombination mit Farbgläsern eine Verminderung der Durchlässigkeit mit sich bringt, so ließ sich nur bei den Filtern mit hoher Durchlässigkeit eine solche Kombination durchführen.

Trotz der dargestellten Bedenken ist man wohl berechtigt, die bei den Filtern mittlerer Durchlässigkeit stets geringen Restlichtintensitäten näherungsweise gleich zu setzen. Der bei der energetischen Einstellung der Filter entstehende Fehler ist demnach nicht sehr erheblich. Daß Restlichteffekte die Versuchsergebnisse stark beeinflussen, ist nach den gemachten Erfahrungen nicht wahrscheinlich, gewisse störende Einflüsse müssen jedoch angenommen werden.

g) Energieverhältnisse. Die Sporen müssen relativ lange belichtet werden, damit sie zum Keimen kommen. Unter allen Filtern wurde mit derselben Intensität gearbeitet. Die Interferenzfilter wurden auf 200 erg/cm^{2}sec eingestellt, da sich diese Intensität als günstig erwies und den Lampen zugemutet werden konnte.

h) Die Temperatur. Alle Keimversuche, abgesehen von den Fällen, wo die Temperatureffekte selber zu untersuchen waren, wurden in einer Klimakammer mit starker Ventilierung bei 20° C ausgeführt. Eine weitgehende Temperaturkonstanz ist für Untersuchungen der vorliegenden Art unerläßlich. Da dies bei früheren Arbeiten über Sporenkeimung nicht erreicht werden konnte, entstanden

dadurch sicher erhebliche Fehler. Da die Interferenzfilter keine Wärmestrahlung durchlassen und auch selber keine Quelle sekundärer Wärmestrahlung darstellen, so war auch nach tagelanger Belichtung die Temperatur im Agar kaum meßbar von 20° C verschieden. Temperaturmessungen im Agar wurden mit einem empfindlichen Thermoelement (Thermonadel) der Firma Hartmann und Braun vorgenommen (Empfindlichkeit: 0,2° C).

i) Weißlicht. Für die Weißlichtversuche, die ebenfalls in der Klimakammer stattfanden, wurde mittels Fluorescenzröhren (Sylvania, 6 W, White) ein kleines, nahezu homogen ausgeleuchtetes Lichtfeld (Kaltlicht) hergestellt. Die Intensität betrug etwa 650 Lux.

k) Auswertung und Darstellung der Keimversuche. Die Auswertung der Keimversuche kann nur durch Herstellung repräsentativer Stichproben geschehen. Es muß eine Stichprobe möglichst umfangreich sein, damit der Stichprobenfehler möglichst niedrig bleibt. Die Sporen wurden auf dem Agar so dicht ausgesät, daß pro Blickfeld bei 120facher Vergrößerung 15—25 Sporen vorhanden waren. Bei dieser Dichte ist kein Gruppeneffekt zu befürchten. Es wurden nun 40—50 beliebige Blickfelder ausgezählt, insgesamt mindestens 800 Sporen. Stärker verpilzte Stellen wurden gemieden.

In der Arbeit sind typische Kurven angegeben, die jeweils, von den Vorversuchen abgesehen, aus mehreren vorliegenden Kurven ausgewählt wurden. Oft sind die Meßpunkte auf die Auszählung mehrerer tausend Sporen begründet. Der absolute mittlere Fehler des arithmetischen Mittels der mit demselben Filter gewonnenen Versuchsergebnisse liegt dann im Bereich von 1—2%.

In der neuesten amerikanischen Literatur wird zuweilen für die Darstellung der Ergebnisse spektraler Untersuchungen die probit-Transformation verwendet und die für einen bestimmten Effekt benötigte Energie als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. In dieser Arbeit soll jedoch die in der deutschen Literatur übliche Methode, die Keimprozente in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei konstanter Energie aufzutragen, beibehalten werden, da sich aus einer probit-Darstellung keine wesentlichen Vorteile ergeben würden. Wenn man die Variabilität der Sporen hinsichtlich ihrer Lichtbedürftigkeit kennt und berücksichtigt, so lassen sich auch ohne probit-Transformation brauchbare Aktionsspektren gewinnen.

4. Die Vorversuche.

Da in dieser Arbeit der Einfluß monochromatischen Lichtes auf die Keimung untersucht werden soll, müssen die übrigen Voraussetzungen der Keimung möglichst konstant und möglichst optimal gehalten werden. Es ist also nötig, über die Reaktionen der Sporen auf verschiedene Außeneinflüsse einen gewissen Überblick zu gewinnen, ehe die eigentliche Arbeit, die Analyse der Effekte der verschiedenen Spektralbereiche, erfolgen kann.

a) Die Keimkriterien. Wann eine Spore als gekeimt zu bezeichnen ist und wann nicht, muß bei quantitativen Arbeiten eindeutig definiert werden. In der älteren Literatur ist der Begriff der Keimung nicht einheitlich gebraucht worden.

Laage (1907) spricht von Keimung, wenn das Exospor geplatzt ist, Fischer (1911b) dagegen meint, die Sprengung des Exospors sei kein Keimkriterium. Orth (1936) schließlich hält die Sprengung des Exospors für einen Quellungseffekt und behauptet, es bestünde ein wesentlicher Unterschied zwischen dem

Platzen des Exospors und der Keimung. Er bezeichnet die Spore als keimend, wenn dem Platzen des Exospors die Entwicklung des ersten Rhizoids oder irgendein anderer Wachstumsvorgang, auch Bildung von Chlorophyll, nachfolgt.

Mindestens bei der von mir untersuchten Art darf die Sprengung des Exospors als Einleitung der Keimung gelten. Diese Sprengung ist offensichtlich eine aktive Leistung der Sporenzelle. Bei Versuchen, die sich mit der Möglichkeit einer Dunkelkeimung befaßten und die allesamt negativ ausfielen, habe ich zwar stets eine gewisse, allerdings geringfügige Quellung der Sporen beobachtet, niemals aber ein geplatztes Exospor festgestellt. Ein Unterschied zwischen der Quellung im Dunkeln und der Quellung im Licht konnte statistisch nicht gesichert werden. (Gemessen wurde die Veränderung von Länge und Breite der auf Agar ausgesäten Sporen!) Freilich kann nach der Sprengung des Exospors durch widrige Außenbedingungen die weitere Keimung unterbunden werden, was den Eindruck erwecken mag, die Sprengung des Exospors sei vom eigentlichen Keimvorgang unabhängig. Unter günstigen Bedingungen, wie sie in meinen Keimversuchen gegeben waren, habe ich nur äußerst selten beobachtet, daß eine Spore, deren Exospor geplatzt war, sich nicht weiter entwickelt hat. Das geplatzte Exospor als Keimkriterium zu verwenden, habe ich jedoch vermieden, weil die Feststellung der Risse im Exospor unter Umständen schwierig und zeitraubend ist und bei ungünstiger Lage der Sporen zu Fehlern führen kann. Um sicher zu gehen, habe ich mit der Auswertung der Versuche solange gewartet, bis die meisten Sporen, bei denen die Keimung induziert war, sich soweit entwickelt hatten, daß der Sporeninhalt bereits ergrünte und eine Unterscheidung der gekeimten von den ungekeimten Sporen ohne jede Schwierigkeit möglich war. Für Zweifelsfälle wurden folgende Keimkriterien definiert: 1. Weit aufgerissenes Exospor. 2. Starke Quellung und Ausdehnung des Sporeninhaltes. 3. Auffällige Ergrünung des Sporeninhaltes. Sind alle drei Merkmale vorhanden, so ist die Spore gekeimt.

b) Festlegung des Zeitpunktes für die Auswertung der Keimversuche. Die Sporen wurden nicht sofort nach der Aussaat belichtet, sondern erst zwei Tage im Dunkeln gehalten (Vorquellung). Dann wurden sie 12 Stunden mit Fluorescenzlicht belichtet. Die Prüfung auf Keimung erfolgte 2, 4, 6, 8 Tage nach Einsatz der Belichtung unter strenger Beachtung obiger Keimkriterien (Abb. 2).

Abb. 2 zeigt, daß das Material hinsichtlich seiner Keimgeschwindigkeit ziemlich einheitlich ist und daß bereits nach etwa 6 Tagen praktisch alle Sporen, bei denen die Keimung induziert ist, soweit gekeimt sind, daß sie leicht von den nichtinduzierten Sporen zu unterscheiden sind, die sich, abgesehen von einer geringen Quellung, seit der Aussaat nicht

verändert haben. Nach diesem Ergebnis wurden alle Auswertungen 6 oder 7 Tage nach Einsetzen des fördernden Lichtes vorgenommen.

c) Die Wirkung einer Vorquellung im Dunkeln auf die Lichtempfindlichkeit der Sporen. Meines Wissens ist bisher bei Untersuchungen mit Farnsporen der Einfluß der Vorquellung auf die Lichtempfindlichkeit der Sporen nicht weiter beachtet worden, während bei Samen genaue Untersuchungen vorliegen.

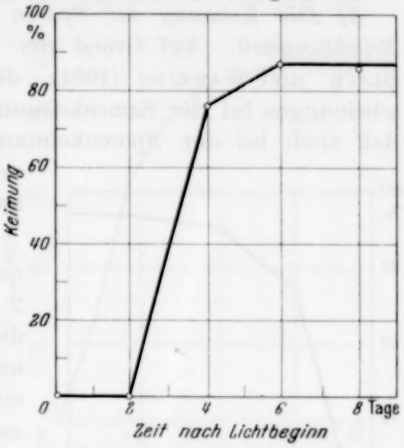


Abb. 2. Die Keimgeschwindigkeit der Sporen. (Keimungsinduktion durch 12stündige Bestrahlung mit Fluorescenz-Licht.)

Zur Prüfung wurden die Sporen wie üblich auf Agar ausgesät und dann im Dunkeln gehalten. Die Belichtung erfolgte im Fluorescenz-Lichtfeld. Die Belichtungszeit betrug 24 Stunden (Abb. 3).

Die Lichtempfindlichkeit steigt, wie Abb. 3 zeigt, mit zunehmender Vorquellung. Ein Abfall der Lichtempfindlichkeit ließ sich innerhalb des geprüften Bereiches und unter den herrschenden Versuchsbedingungen nicht beobachten.

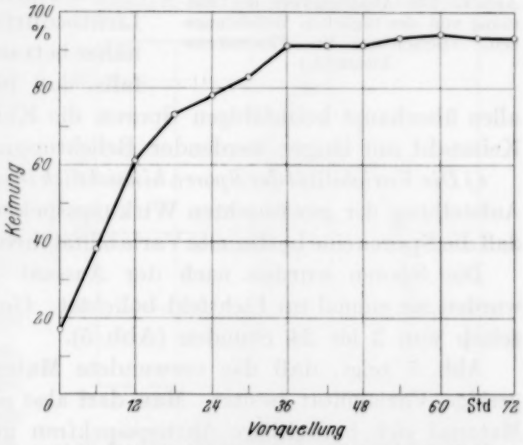


Abb. 3. Die Abhängigkeit der Lichtempfindlichkeit von der Vorquellungszeit. (24stündige Belichtung mit Fluorescenz-Licht.)

Wenn man also den Vorquellungseffekt ausnützt, so kann man die für eine bestimmte Keimzahl nötige Belichtungszeit erheblich herabsetzen. Andererseits sollte die Keiminduktion durch Licht möglichst bald nach der Aussaat auf den Agar vorgenommen werden, um eine eventuelle störende Wirkung von Pilzen auf Agar und Farnsporen zu vermeiden. Es ließ sich nämlich nicht verhindern, daß zuweilen mit den Farnsporen auch einige Pilzsporen auf den Agar gelangten und dort auskeimten. Als günstiger Kompromiß hat sich eine Vorquellung von 1 Tag erwiesen, zuweilen wurden auch 2 Tage

Vorquellung benützt. Ein störender Einfluß geringer Verpilzung konnte unter diesen Umständen nicht beobachtet werden.

d) Die Keimung der Sporen in Abhängigkeit von der täglichen Belichtungszeit. Auf Grund der Arbeiten von ISIKAWA (1954) und BLACK und WAREING (1954), die sich mit photoperiodischen Erscheinungen bei der Samenkeimung befassen, könnte man annehmen, daß auch bei der Sporenkeimung eine Abhängigkeit der Keimung von der täglichen Belichtungszeit vorhanden wäre.

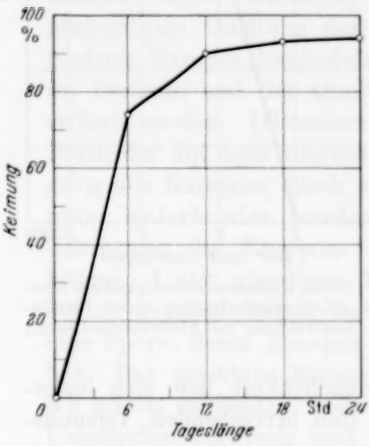


Abb. 4. Die Abhängigkeit der Keimung von der täglichen Belichtungszeit. (Belichtung im Fluorescenz-Lichtfeld.)

Die Sporen wurden 1 Tag vorgequollen und während der folgenden 2 Tage im Lichtfeld belichtet, wobei die tägliche Belichtungszeit 6, 12, 18 und 24 Stunden betrug. Die Sporen scheinen sich (Abb. 4) wie „Langtagsamen" zu verhalten, d. h. die Keimzahl ist um so höher, je länger täglich belichtet wird. Offensichtlich ist Dauerlicht am günstigsten. ISIKAWA berichtet über ähnliche Ergebnisse mit Sporen von *Athyrium niponicum*.

Im folgenden Abschnitt, in dem die Lichtbedürftigkeit der Sporen etwas näher betrachtet wird, zeigt sich ebenfalls, daß bis zu dem Punkt, wo bei allen überhaupt keimfähigen Sporen die Keimung induziert wird, die Keimzahl mit länger werdender Belichtungszeit ansteigt.

e) Die Variabilität der Sporen hinsichtlich ihrer Lichtbedürftigkeit. Bei der Aufstellung der gewünschten Wirkungsspektren muß beachtet werden, daß die Sporen eine bestimmte Variabilität ihrer Lichtbedürftigkeit zeigen.

Die Sporen wurden nach der Aussaat 2 Tage gequollen. Dann wurden sie einmal im Lichtfeld belichtet. Geprüft wurden Belichtungszeiten von 3 bis 24 Stunden (Abb. 5).

Abb. 5 zeigt, daß das verwendete Material eine günstige, relativ geringe Variabilität besitzt. Man darf also annehmen, daß mit diesem Material sich brauchbare Aktionsspektren gewinnen lassen. Aus dem Kurvenverlauf werden folgende Schlüsse gezogen, die für die weiteren Untersuchungen wichtig sind.

1. Ein günstiges Aktionsspektrum mit steilem Gipfel wird sich dann ergeben, wenn die Sporen vernachlässigt werden, die ein extrem großes Lichtbedürfnis haben. Es wird vorteilhaft sein, wenn der Gipfelpunkt des Aktionsspektrums der Keimförderung im Bereich von 70—75% Keimung liegt.

2. Soll die Hemmwirkung bestimmter Spektralbereiche auf die Keimung geprüft werden, so ist es am günstigsten, im Bereich der größten Steigung der Variationskurve zu arbeiten, da man dort den größten Hemmeffekt erwarten darf. Praktisch wird man also so vorgehen, daß man etwa 50% Keimung induziert und anschließend das Hemmlicht auf die induzierten Sporen einwirken läßt.

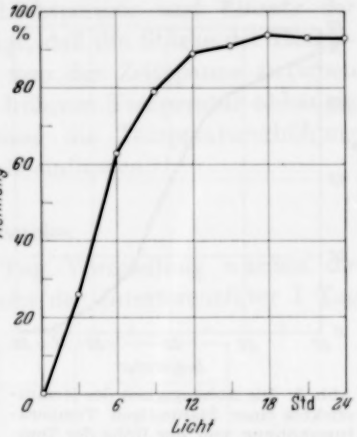


Abb. 5. Die Abhängigkeit der Keimung von der eingestrahlten Lichtmenge. (Fluorescenz-Licht.)

f) Die Abhängigkeit der Keimung vom p_H*-Wert des Agars.* Schon FISCHER (1911a) hat an Sporen von *Aspidium remotum* beobachtet, daß bei Zugabe von KH_2PO_4 Keimung eintritt, bei Zugabe von K_2HPO_4 jedoch nicht. Diese und ähnliche Mitteilungen für Samen legten es nahe, die Abhängigkeit der Keimung vom p_H-Wert des Substrates zu untersuchen.

Für die Einstellung eines bestimmten p_H-Wertes im Agar wurden HCl und NaOH verwendet (pro analysi-Substanzen von Merck). Daß nicht etwa wechselnde Konzentrationen von Na^+ und Cl^- wirksam sind, wurde durch Kontrollen mit NaCl (ebenfalls p.a.-Substanz von Merck) gezeigt, welches, in entsprechender Konzentration zugefügt, keinen meßbaren Effekt auf die Keimung ausübt.

Die Messung des p_H-Wertes erfolgte mit p_H-Papier von Merck, da keine geeignete Elektrode zur Verfügung stand. Es muß deshalb mit den üblichen Fehlern dieser p_H-Meßmethode gerechnet werden.

Eine Vorquellung wurde bei diesen Experimenten nicht vorgenommen. Die 2tägige Belichtung setzte sofort nach der Aussaat ein. Die Auswertung erfolgte 6 Tage nach Beginn der Belichtung (Abb. 6).

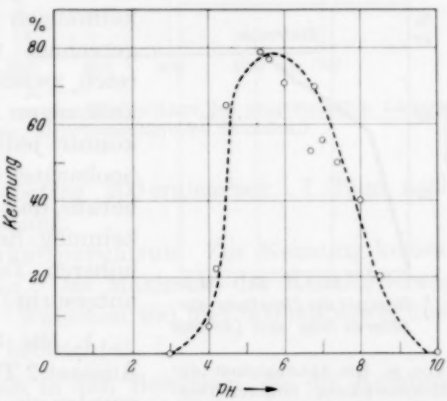


Abb. 6. Die Abhängigkeit der Keimung vom p_H-Wert des Agars. (Auswertung 6 Tage nach Lichtbeginn.)

Es scheint sich bei der gewonnenen Kurve um eine etwas asymmetrische Optimumkurve zu handeln. Da der p_H-Wert des verwendeten Agars im Bereich von 5,4 liegt, dürfen die p_H-Bedingungen der Keimversuche als sehr günstig bezeichnet werden.

g) Keimung im Dunkeln. Über keimungsauslösende Wirkung von Chemikalien ist öfters berichtet worden (vgl. z. B. LAAGE 1907 und GASSNER 1915). Die Frage, ob sich auch bei den verwendeten Sporen der Lichteffekt bei der Keimung durch Chemikalien erreichen läßt, wurde nicht weiter geprüft, nachdem in Versuchen mit KNOPscher Nährlösung keinerlei Keimung erzielt werden konnte.

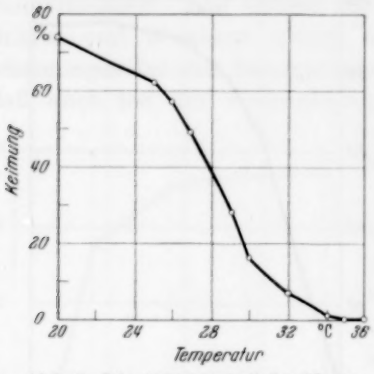


Abb. 7. Die Abhängigkeit des Hemmeffektes einer 24stündigen Temperaturerhöhung von der Höhe der Temperatur. (Die höhere Temperatur wird sofort nach Ende der Lichtperiode geboten.)

h) Die Wirkung der Temperatur. Die Ansichten der älteren Autoren über die Wirkung einer Temperaturerhöhung auf die Keimung von Sporen sind nicht einheitlich. Verschiedene Sporenarten scheinen sich verschieden zu verhalten (vgl. ORTH 1937). Jedenfalls kann man nicht allgemein sagen, daß höhere Temperatur die Keimung fördert. Oft wurde nämlich gefunden, daß höhere Temperatur die Keimung hemmt.

Bei allen Lichtversuchen mit den *Dryopteris*-Sporen wird die Temperatur von 20° C konstant festgehalten. Der Umstand, daß dabei keine Dunkelkeimungen auftreten, ist für die Lichtversuche sehr günstig. Da aber mit der Möglichkeit von Dunkelkeimungen in anderen Temperaturbereichen gerechnet werden mußte, wurde der Bereich zwischen 5 und 30° C auf Dunkelkeimungen hin untersucht. Nach 15 Tagen konnte jedoch niemals eine Dunkelkeimung beobachtet werden. Es stellte sich aber heraus, daß Temperaturerhöhung die Sporenkeimung hemmt. Diese Hemmwirkung der höheren Temperatur wurde nun genauer untersucht.

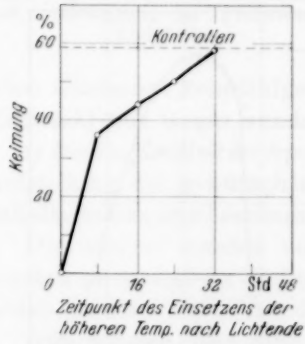


Abb. 8. Die Abhängigkeit der Hemmwirkung höherer Temperatur (30°) von dem zeitlichen Intervall zwischen Ende der Lichtperiode und Einsatz der höheren Temperatur.

1. Die Sporen wurden sofort nach der Aussaat 2 Tage im Lichtfeld belichtet. Dann wurden sie 1 Tag bei höherer Temperatur im Dunkeln gehalten und anschließend in den 20°-Raum zurückgebracht. Die Auswertung erfolgte, wie auch bei den folgenden Versuchen, 6 Tage nach Lichtbeginn. In Abb. 7 sind die Resultate dargestellt. Man sieht, daß mit steigender Temperatur der Hemmeffekt in charakteristischer Weise größer wird. (Zwischen 20 und 25° erfolgten keine Messungen.)

2. Die Sporen wurden nach der Aussaat 2 Tage vorgequollen. Dann folgte eine 6stündige Belichtung im Lichtfeld. Nun wurden die Schälchen für 1 Tag in einen 30°-Thermostaten gebracht. Dabei wurde der zeitliche Abstand zwischen Ende der Lichtperiode und Einsatz der höheren Temperatur variiert. Abb. 8 zeigt, daß die Stärke der Hemmwirkung durch die höhere Temperatur von der Zeitspanne zwischen Ende der Lichtperiode und Einsatz der höheren Temperatur abhängig ist. 32 Stunden nach Lichtende vermag die Temperaturerhöhung die Keimung nicht mehr wesentlich zu beeinflussen.

5. Die Hauptversuche.

a) Das Förderspektrum. Nach 1 Tag Vorquellung wurden die Sporen mit dem monochromatischen Licht der Interferenzfilter 1 Tag

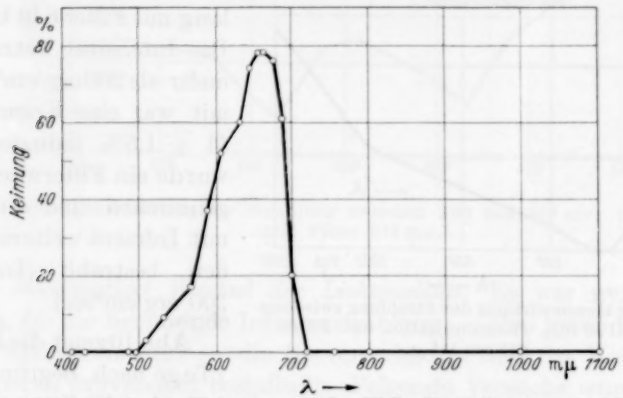


Abb. 9. Die Abhängigkeit der Keimung von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes. (Intensität: 200 erg/cm²sec, Belichtungszeit 24 Stunden.)

lang bestrahlt. Die Intensität betrug 200 erg/cm²sec. 7 Tage nach Lichtbeginn erfolgte die Auswertung.

Abb. 9 zeigt das erzielte Wirkungsspektrum: Zur Keimung kommt es nur zwischen 500 und 700 mμ. Das Maximum der Keimförderung liegt zwischen 650 und 670 mμ. Zwischen 400 und 500 mμ sowie über 700 mμ wurde keine Keimung beobachtet.

Die weitere Frage ist nun, ob in den Bereichen, die die Keimung nicht fördern, das Licht keinen Einfluß auf die Sporen hat oder ob es die Keimung aktiv hemmt. Der sehr steile Abfall des Förderspektrums gegen das Langwellige hin läßt zumindest für diesen Bereich eine aktive Hemmwirkung erwarten, weil sonst die Art der Energieverteilung in den Durchlässigkeitsspektren der Filter trotzt der relativ großen Homogenität des Sporenmaterials zu einem weniger schroffen Verlauf des Förderspektrums führen müßte. Weiterhin zeigt die Beobachtung,

daß auch bei stark vermehrter Energieeinstrahlung, die im Bereich maximaler Förderung zu einer Keimung aller überhaupt keimfähigen Sporen führt, unterhalb 500 mμ und oberhalb 700 mμ keinerlei Keimungen auftreten, daß wir für diese Bereiche eine aktive Hemmwirkung auf die Keimung zu erwarten haben.

Die folgenden Versuche sollen den Effekt dieser Bereiche aufklären.

b) Die Hemmspektren. 1. Prüfung des Bereichs von 700—1100 mμ. Wie sich sogleich zeigen wird, kann dieser Bereich hinsichtlich seiner physiologischen Wirkung als ein einheitlicher Spektralbereich betrachtet werden. Der Kürze halber sei die Strahlung dieser Wellenlängen als Infrarotstrahlung bezeichnet, obwohl darin noch Wellenlängen vorhanden sind, die man als dunkelrot bzw. purpurn wahrnehmen kann.

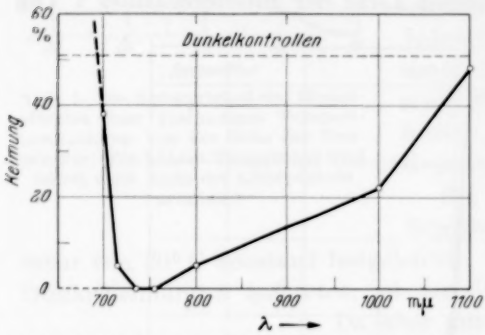


Abb. 10. Die Hemmwirkung der Strahlung zwischen 700 und 1100 mμ. (Keiminduktion mit Filter 649 mμ.)

Nach 1 Tag Vorquellung wurden die Sporen 12 Stunden lang mit Filter 649 bestrahlt. Die Intensität betrug wenig mehr als 200 erg/cm²sec. Damit war eine Keimung von 51 $\pm$ 1,5% induziert. Nun wurde ein Filterwechsel vorgenommen und die Sporen mit Infrarot weitere 12 Stunden bestrahlt (Intensität: 200 erg/cm²sec).

Abb. 10 zeigt die Keimung 7 Tage nach Beginn des fördernden Lichtes. Die Infrarotstrahlung hemmt also die Sporenkeimung stark. Das Maximum der Wirksamkeit liegt im Bereich von 730—750 mμ.

2. Prüfung des Bereichs von 400—500 mμ. Die Versuchsanordnung ist ähnlich wie oben. Nach 1 Tag Vorquellung werden die Sporen 12 Stunden mit Filter 679 (Intensität 200 erg/cm²sec) belichtet. Damit waren 48 $\pm$ 2,5% Keimung induziert. Nach dem Filterwechsel wurden die Sporen 12 Stunden lang mit dem kurzwelligen Licht bestrahlt. In Abb. 11 sind die Resultate dargestellt.

Auch das kurzwellige Licht übt eine ausgesprochen hemmende Wirkung auf die Sporenkeimung aus. Das Aktionsspektrum scheint zwei reale Maxima zu haben, bei 445 und bei 485 mμ.

c) Umkehrversuche. Es wurde nun die Frage gestellt, ob Infrarotstrahlung und Blaulicht auch hemmend wirken, wenn sie *vor* dem fördernden Licht auf die Sporen einwirken.

Die folgende Übersicht gibt den Versuchsablauf und die Ergebnisse wieder (1 Tag Vorquellung, Intensität des Förderlichtes wenig mehr

als 200 erg/cm²sec, Auswertung 6 Tage nach Beginn des fördernden Lichtes).

12 Stunden 754 mμ — 12 Stunden 649 mμ: 65 ± 1,0% Keimung
12 Stunden Dunkel — 12 Stunden 649 mμ: 66 ± 1,2% Keimung
12 Stunden 445 mμ — 12 Stunden 649 mμ: 65 ± 1,8% Keimung

Das Resultat ist eindeutig: Ein Hemmeffekt von Blau und Infrarot läßt sich nur dann nachweisen, wenn die Strahlung auf Sporen einwirkt, bei denen durch eine Bestrahlung mit förderndem Licht die Keimung induziert worden ist.

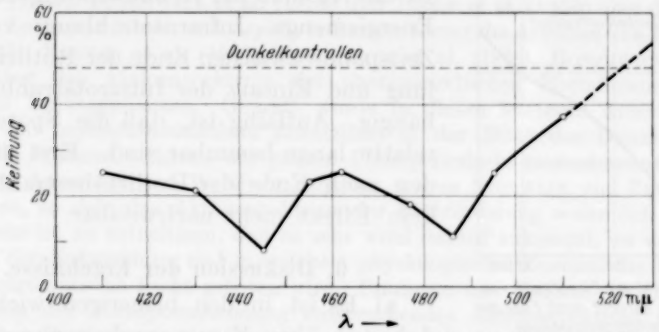


Abb. 11. Die Hemmwirkung der Strahlung zwischen 400 und 500 mμ. (Keiminduktion mit Filter 679 mμ.)

d) Mehrmaliger Wechsel der Lichtqualität. Es war nun weiter zu prüfen, ob die hemmende Infrarotstrahlung — also jene, die auf induzierte Sporen einwirkt —, die Sporen schädigt oder das Keimvermögen der Sporen irreversibel beeinflußt. Folgende Versuche wurden deshalb durchgeführt: (1 Tag Vorquellung, Auswertung 6 Tage nach Beginn des fördernden Lichtes).

12 Stdn. 679 mμ: 48 ± 2% Keimung
12 Stdn. 679 mμ — 12 Stdn. 754 mμ: 0% Keimung
12 Stdn. 679 mμ — 12 Stdn. 754 mμ — 12 Stdn. 679 mμ: 68 ± 2% Keimung

Die Kontrolle zu der letzten Versuchsreihe ergab 66% Keimung (2 Tage Vorquellung, 12 Stunden 679 mμ). Die Steigerung der Keimzahl bei der 2. Förderung geht also wohl auf die inzwischen erfolgte Steigerung der Empfindlichkeit zurück, die als Vorquellungseffekt zu deuten ist.

Damit darf angenommen werden, daß der Effekt des Rotlichtes von der darauffolgenden Infrarotbestrahlung zwar gänzlich aufgehoben wird und die Sporen wieder in einen Zustand versetzt werden, als seien sie nie mit Rotlicht bestrahlt worden, daß aber die Hemmung mit Infrarot sich auf die darauffolgende Rotbestrahlung nicht auswirkt.

Diese Befunde entsprechen den Resultaten ähnlicher Experimente an keimenden Samen (Borthwick et al. 1954 und Toole et al. 1955).

e) Weitere Versuche mit Infrarot. In Analogie zu den Versuchen mit höherer Temperatur mußte nun noch geprüft werden, ob der Infrarot-Effekt von dem zeitlichen Intervall zwischen Ende der Rotlichtbestrahlung und Beginn der Infrarotbestrahlung abhängig ist.

Nach 24 Stunden Vorquellung wurde mit Filter 679 12 Stunden belichtet und dadurch 48% Keimung induziert. Mit Filter 754 wurde ebenfalls 12 Stunden bestrahlt. Der Einsatz der Infrarotstrahlung wurde zeitlich variiert. Die Ergebnisse finden sich in Abb. 12.

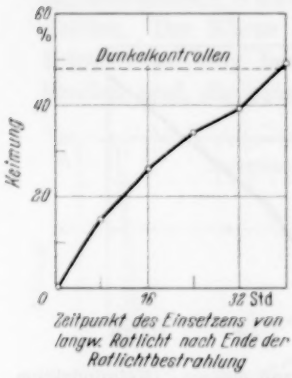


Abb. 12. Die Abhängigkeit der Hemmwirkung 12stündiger Infrarotbestrahlung von dem zeitlichen Intervall zwischen Ende der Rotlichtbestrahlung und Beginn der Infrarotbestrahlung. (Filter 679 mμ und 754 mμ.)

Ganz analog zu dem Temperatureffekt ist das Ausmaß der Hemmwirkung derselben Energiemenge Infrarotstrahlung von der Zeitspanne zwischen Ende der Rotlichtstrahlung und Einsatz der Infrarotstrahlung abhängig. Auffällig ist, daß die Sporen doch relativ lange hemmbar sind. Erst 40 Stunden nach Ende der Rotlichtbestrahlung ist kein Effekt mehr nachweisbar.

6. Diskussion der Ergebnisse.

a) Es ist in den bisherigen wichtigeren Arbeiten über Farnsporenkeimung (KLEBS, STEPHAN, ORTH) mehr oder minder deutlich gezeigt worden, daß ein gewisser Antagonismus zwischen kurzwelligen und längerwelligen Strahlen bei der Auslösung der Keimung besteht. Während STEPHAN, außer im Infrarot, in allen Spektralbereichen eine Keimung erhielt, die allerdings in Blau und Grün verzögert war, konnten KLEBS und ORTH eine keimungshemmende Wirkung des Blaulichtes nachweisen. Letztere Befunde können bestätigt werden. Der starke hemmende Einfluß des nahen Infrarot ($\lambda > 700$ mμ) mit einem Maximum der Hemmung im Bereich von 750 mμ wurde von den genannten Autoren nicht aufgefunden. ORTH z. B. bezeichnet den Bereich um 710 mμ als ausgesprochen fördernd. Um 1000 mμ konnte er allerdings eine Hemmwirkung feststellen. Weiter fand ORTH bei den von ihm untersuchten Sporen das Maximum der Keimung im Bereich von 570 mμ, was meinen Ergebnissen widerspricht, und was auch im Gegensatz zu den Angaben von KLEBS steht, der diesem Spektralbereich bereits eine Mittelstellung zwischen den angrenzenden Bereichen zuerkannte. Den Bereich um 655 mμ bezeichnet ORTH als fördernd bei genügend hoher Intensität.

b) In jüngster Zeit wurden besonders von amerikanischen Forschern für einige lichtabhängige physiologische Vorgänge Aktions-

spektren aufgestellt, die mit dem Aktionsspektrum der Farnsporenkeimung weitgehend übereinstimmen. Eine antagonistische Wirkung von Rot- und Infrarotstrahlung ist für diese Aktionsspektren bezeichnend, charakteristisch ist ferner der Umstand, daß Infrarot, nach Rotlicht gegeben, den Einfluß von Rotlicht vollständig aufheben kann und umgekehrt, daß diese wechselnde Belichtung mehrere Male durchgeführt werden kann und daß der Effekt auf den physiologischen Vorgang lediglich von der zuletzt gebotenen Strahlung abhängt.

Es seien erwähnt die Arbeiten von BORTHWICK et al. (1952b), EVENARI und NEUMANN (1953), BORTHWICK et al. (1954) und TOOLE et al. (1955) über die Keimung von *Lactuca*-Achänen und *Lepidium*-Samen, ferner die Arbeiten von PARKER et al. (1945), PARKER et al. (1946), BORTHWICK et al. (1948), BORTHWICK et al. (1952a) über das Aktionsspektrum der photoperiodischen Beeinflussung von Lang- und Kurztagpflanzen. Geprüft wurde in diesen letzteren Arbeiten die Wirkung von monochromatischem Zusatzlicht in der Mitte der Dunkelphase. Werden die Pflanzen während der ganzen Photoperiode in monochromatischem Licht unter Ausschluß von Weißlicht gehalten, wie es STOLWIJK und ZEEVAART (1955) taten, so sieht das Aktionsspektrum der Blühförderung wesentlich anders aus. Daraus ist zu entnehmen, daß es sehr wohl darauf ankommt, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung und in welchem physiologischen Zustand der Pflanze das monochromatische Licht geboten wird. PIRINGER und HEINZE (1954) haben ebenfalls ein der Farnsporenkeimung entsprechendes Aktionsspektrum für die Bildung eines Pigmentes in der Tomatenepidermis aufgefunden. Auch die Untersuchungen von PARKER et al. (1949) über das Aktionsspektrum des Blatt- und Stengelwachstum etiolierter Erbsen gehören hierher, obwohl hier die Rolle des Infrarots noch nicht genügend geklärt ist. Eine kurze Zusammenfassung der bisherigen Untersuchungen stammt von PIRINGER et al. (1954). HENDRICKS und BORTHWICK (1954) diskutieren speziell die Zeitabhängigkeit der mit dem Photoperiodismus zusammenhängenden Reaktionen. Auch hier wird immer wieder festgestellt, daß das Ausmaß der Hemmbarkeit durch hemmende Strahlung vom zeitlichen Intervall zwischen fördernder und hemmender Strahlung abhängt.

Während Rotlicht und Infrarotstrahlung für die angeführten Vorgänge von entscheidender Bedeutung sind, scheint die Rolle des kurzwelligen sichtbaren Lichtes nicht so einheitlich und auch nicht so wesentlich zu sein. Die klaren Verhältnisse, die FLINT und MCALISTER (s. die oben zitierten Arbeiten) im Blaulicht festgestellt haben, konnten offenbar in den neuen Arbeiten zur Samenkeimung nicht entsprechend reproduziert werden, während die Angaben von FLINT und MCALISTER über die Wirkung von Rot- und Infrarotstrahlung voll bestätigt werden konnten.

c) Zur Deutung dieser Aktionsspektren ist von BORTHWICK und Mitarbeitern (s. die oben zitierten Arbeiten), die besonders von den Ergebnissen der Wechselbelichtung mit Rot und Infrarot ausgingen, eine Vorstellung entwickelt worden, deren Zentralpunkt ein reversibles Pigmentsystem ist, jenes Pigmentsystem, welches die wirksame Strahlung absorbiert. Ein Pigment, welches im Rot maximal absorbiert, geht unter dem Einfluß dieser Strahlung in ein Pigment über, welches

seine Hauptabsorption im langwelligen Rot und im nahen Infrarot hat ($\lambda > 700$ mμ). Dieses Infrarotpigment wiederum geht bei Bestrahlung mit Infrarot in das rotabsorbierende Pigment über. Während man zunächst eine reversible Isomerisation des wirksamen Pigments vermutet hat (BORTHWICK et al. 1954), sind heute die Ansichten etwas komplizierter geworden (TOOLE et al. 1955).

Soweit ich es übersehe, gibt es keinen absolut zwingenden Beweis für die von den amerikanischen Forschern aufgestellte Hypothese. Man kann aber mit Hilfe dieser Hypothese im wesentlichen die heute bekannten experimentellen Fakten befriedigend deuten. Es soll deshalb hier darauf verzichtet werden, andere mögliche Hypothesen aufzubauen, obwohl man beachten muß, daß die Vorstellung, daß zwei voneinander relativ unabhängige Pigmente auf ein und denselben Prozeß, von dem dann die weitere Folgereaktion ausgeht, fördernd oder hemmend einwirken, bisher noch nicht endgültig ausgeschlossen werden konnte und im Auge behalten werden muß.

d) Hinsichtlich der Hemmwirkung des Blaulichtes möchte ich die Ansichten von BORTHWICK et al. (1954) nicht übernehmen. Denn es wird von ihnen angenommen, daß im Blaubereich sowohl das Rot- wie auch das Infrarotpigment absorbieren, da sowohl Keimförderung wie auch Keimhemmung durch Blaulicht beobachtet wurden. Bei den Sporen ist es offensichtlich anders. Ich habe im Blaubereich niemals eine Keimung beobachtet, sondern stets nur eine Hemmwirkung festgestellt. Da dieser Hemmwirkung auf die Keimung eine sehr starke Hemmwirkung der blauen Strahlung auf das Protonemenwachstum entspricht, so möchte ich annehmen, daß in beiden Fällen dasselbe gelbe Pigment die Absorption durchführt. Man kann weiter annehmen, daß das blauabsorbierende Pigment unabhängig von dem reversiblen Pigmentsystem als Sensibilisator an der Hemmreaktion beteiligt ist.

Ein Effekt des kurzwelligen Lichtes scheint weit verbreitet zu sein. Auf die bekannten Wirkungen braucht nicht näher hingewiesen zu werden. Lediglich einige Angaben aus der neueren Literatur seien noch erwähnt, nämlich die Befunde von VIRGIN (1952, 1954) über lichtinduzierte Wechsel der Plasmaviscosität und die Ergebnisse von SAGROMSKY (1952) über den Einfluß farbigen Lichtes auf die Conidienbildung bei *Penicillium*. In beiden Fällen erwies sich lediglich kurzwelliges Licht als wirksam, was auch bei anderen Untersuchungen an Pilzen festgestellt wurde (SCHNEIDERHÖHN 1954).

e) Man muß also, wenn man das Aktionsspektrum der Farnsporenkeimung deuten will, drei verschiedene Pigmente annehmen, von denen zwei in der oben dargestellten Weise leicht ineinander übergehen. Es ist nun zu fragen, ob man über die chemische Natur dieser Pigmente etwas aussagen kann.

1. Das Aktionsspektrum im kurzwelligen Hemmbereich erinnert an die Absorptionskurven von Carotinoiden. Daß in Farnsporen Carotinoide vorkommen, hat ORTH (1936) gezeigt. Man muß jedoch damit rechnen, daß im kurzwelligen, sichtbaren Spektralbereich eine starke, störende Absorption durch die gelbbraunen Farbstoffe des Exospors erfolgt. Ferner könnten komplizierte Schirmeffekte der in der Spore vorhandenen Carotinoide vorliegen. Ob ein Carotinoid die entscheidende Absorption vornimmt, kann deshalb nicht sicher erschlossen werden.

2. Über die chemische Natur der Rot und Infrarot absorbierenden Pigmente ist nichts Sicheres bekannt. Es wird angenommen, daß es sich um einen mit dem Chlorophyll verwandten Pyrrol-Farbstoff handelt, da die erwähnten Aktionsspektren bei solchen Pflanzen auftreten, die in der Lage sind, auch Chlorophyll zu bilden. TODD und GALSTON (1954) haben aus chlorophyllfreien *Poa*-Samen einen Farbstoff isoliert, der mit dem Methyl-pyro-phäophorbid A identisch sein soll und ähnliche Absorptionseigenschaften hat, wie man sie von dem fraglichen Pigment erwarten muß. (Allerdings besitzt das isolierte Pigment auch eine sehr starke Absorption im Blau-Violett!) Da jedoch die Nachahmung des reversiblen Pigmentsystems in vitro nicht gelang, steht der direkte Beweis noch aus.

Zusammenfassung.

1. Die Beeinflussung der Keimung von Farnsporen *(Dryopteris filix-mas)* durch monochromatisches Licht (Interferenzfilter) wurde untersucht. Geprüft wurde der Bereich zwischen 400 und 1100 mμ. Im Dunkeln keimten die Sporen nicht.

2. Die Keimung wird nur durch Licht der Wellenlängen von 500 bis 700 mμ ausgelöst. Das Maximum der Keimförderung liegt im Bereich von 650—670 mμ.

3. Von kurzwelligem Licht (400—500 mμ) wird die durch Rotlicht induzierte Keimung aktiv gehemmt. Das Wirkungsspektrum scheint zweigipfelig zu sein.

4. Hemmend auf die rotlichtinduzierte Keimung wirkt auch langwellige Strahlung ($\lambda > 700$ mμ). Das Maximum der Hemmwirkung liegt im Bereich von 730—750 mμ.

5. Wird die hemmende Strahlung *vor* dem fördernden Rotlicht gegeben, so läßt sich kein Hemmeffekt nachweisen. Werden die durch langwellige Strahlung gehemmten Sporen erneut mit Rotlicht bestrahlt, so verhalten sie sich so, als wären sie zuvor noch gar nie bestrahlt worden.

6. Auch der Einfluß der Temperatur wurde genauer untersucht. Höhere Temperatur hemmt die Sporenkeimung.

7. Die Wirksamkeit der hemmenden Strahlung ist, ebenso wie die Wirksamkeit einer Temperaturerhöhung, von dem zeitlichen Intervall zwischen Ende des fördernden Lichtes und Beginn des hemmenden Einflusses abhängig. Ist eine gewisse Zeit nach Beendigung der Keiminduktion vergangen, so üben die genannten Faktoren keine Hemmwirkung mehr aus.

8. Das gewonnene Aktionsspektrum stimmt mit anderen in neuerer Zeit aufgestellten Aktionsspektren, z. B. dem des Lichteinflusses auf die Samenkeimung und dem der photoperiodischen Beeinflussung, gut überein.

9. Die Natur der für Hemmung und Förderung entscheidenden Pigmente wird diskutiert.

Für die Anregung zu der vorliegenden Untersuchung und für das stets rege Interesse am Fortgang der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. E. BÜNNING herzlich danken.

Auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Literatur.

BLACK, M., and P. F. WAREING: Photoperiodic control of germination in seed of birch (Betula pubescens Ehrh.). Nature (Lond.) **174**, 705—706 (1954). — BORTHWICK, H. A., S. B. HENDRICKS and M. W. PARKER: Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of a long-day plant, Wintex barley (Hordeum vulgare). Bot. Gaz. **110**, 103—118 (1948). — The reaction controlling floral initiation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **38**, 929—934 (1952a). — BORTHWICK, H. A., S. B. HENDRICKS, M. W. PARKER, E. H. TOOLE and V. K. TOOLE: A reversible photoreaction controlling seed germination. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **38**, 662—666 (1952b). — BORTHWICK, H. A., S. B. HENDRICKS, E. H. TOOLE and V. K. TOOLE: Action of light on lettuce-seed germination. Bot. Gaz. **115**, 205—225 (1954). — EVENARI, M., and G. NEUMANN: The germination of lettuce-seed. III. The effect of light on germination. Bull. Res. Council of Israel. Weizmann mem. iss. **3**, 136—145 (1953). — FISCHER, H.: Wasserkulturen von Farnprothallien, mit Bemerkungen über die Bedingungen der Sporenkeimung. Beih. bot. Cbl. **27**, 54—59 (1911a). — Licht- und Dunkelkeimung bei Farnsporen. Beih. bot. Cbl. **27**, 60—62 (1911b). — FLINT, L. H., and E. D. MCALISTER: Wave length of radiation in the visible spectrum inhibiting the germination of light-sensitive lettuce-seed. Smithsonian Inst. Publ. Misc. Coll. **94**, 1—11 (1935). — Wave length of radiation in the visible spectrum promoting the germination of light-sensitive lettuce-seed. Smithsonian Inst. Publ. Misc. Coll. **96**, 1—7 (1937). — GASSNER, G.: Einige neue Fälle von keimungsauslösender Wirkung der Stickstoffverbindungen auf lichtempfindliche Samen. Ber. dtsch. bot. Ges. **33**, 217 bis 232 (1915). — HENDRICKS, S. B., and H. A. BORTHWICK: Time dependences in photoperiodism. 8. Congr. internat. de Bot., Paris, Sect. **11**, 323—324 (1954). — ISIKAWA, S.: Light-sensitivity against the germination. I. Photoperiodim of seed. Bot. Mag. (Tokyo) **67**, 51—56 (1954). — KLEBS, G.: Zur Entwicklungsphysiologie der Farnprothallien. Teil II und Teil III. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl., Abt. B 8 (1917). — LAAGE, A.: Bedingungen der Keimung von Farn- und Moossporen. Beih. bot. Cbl. **21**, 76—115 (1907). — MEISCHKE, D.: Über den Einfluß der Strahlung auf Licht- und Dunkelkeimer.

Jb. Bot. **83**, 359—405 (1936). — ORTH, R.: Morphologische und physiologische Untersuchungen an Farnprothallien. Planta (Berl.) **25**, 104—150 (1936). — Zur Keimungsphysiologie der Farnsporen in verschiedenen Spektralbereichen. Jb. Bot. **84**, 358—426 (1937). — PARKER, M. W., S. B. HENDRICKS, H. A. BORTHWICK and N. J. SCULLY: Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation in Biloxi soybean. Science (Lancaster, Pa.) **102**, 152—155 (1945). — Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of short-day plants. Bot. Gaz. **108**, 1—26 (1926). — PARKER, M. W., S. B. HENDRICKS, H. A. BORTHWICK and F. W. WENT: Spectral sensitivities for leaf and stem growth of etiolated pea seedlings and their similarity to action spectra for photoperiodism. Amer. J. Bot. **36**, 194—204 (1949). — PIRINGER, A. A., R. J. DOWNS, S. B. HENDRICKS and H. A. BORTHWICK: A reversible photoreaction controlling photoperiodic response, seed germination and other phenomena. 8. Congr. internat. de Bot., Paris, Sect. **11**, 321—323 (1954). — PIRINGER, A. A., and P. H. HEINZE: Effect of light on the formation of a pigment in the tomato fruit cuticle. Plant Physiol. **29**, 467—472 (1954). — RESÜHR, B.: Beiträge zur Lichtkeimung von Amaranthus caudatus L.und Phacelia tanacetifolia Benth. Planta (Berl.) **30**, 471—506 (1939). — SAGROMSKY, H.: Der Einfluß des Lichtes auf die rhythmische Konidienbildung von Penicillium. Flora (Jena) **139**, 300—313 (1952). — SCHNEIDERHÖHN, G.: Das Aktionsspektrum der Wachstumsbeeinflussung durch Licht bei Coprinus lagopus. Arch. Mikrobiol. **21**, 230—236 (1954). — STEPHAN, J.: Untersuchungen über die Lichtwirkung bestimmter Spektralbezirke und bekannter Strahlungsintensitäten auf die Keimung und das Wachstum einiger Farne und Moose. Planta (Berl.) **5**, 381—443 (1928). — STOLWIJK, J. A. J., u. J. A. D. ZEEVAART: Wave length dependence of different light reactions governing flowering in Hyoscyamus niger. Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. C **58**, 386—396 (1955). — TODD, G. W., and A. W. GALSTON: A porphyrin pigment from photosensitive non-chlorophyllous plant tissues. Plant Physiol. **29**, 311—318 (1954). — TOOLE, E. H., V. K. TOOLE, H. A. BORTHWICK and S. B. HENDRICKS: Photocontrol of Lepidium seed germination. Plant Physiol. **30**, 15—21 (1955). — VIRGIN, H. I.: An action spectrum for the lightinduced changes in the viscosity of plant protoplasm. Physiol. Plantarum (Copenh.) **5**, 575—582 (1952). — Further studies of the action spectrum for lightinduced changes in the protoplasmic viscosity of Helodea densa. Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 343—353 (1954).

H. MOHR, Tübingen, Botan. Inst. d. Univ.

Planta, Bd. 46, S. 552—568 (1956).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Erlangen.

DER SAMENANSATZ BEI OENOTHEREN-KREUZUNGEN.

Von

J. Schwemmle und R. Simon.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. November 1955.)

Im Jahre 1949 waren 10 Arten der Sektion *Raimannia* reziprok mit der *Oenothera Hookeri* aus der *biennis*-Gruppe gekreuzt worden. Über die Ergebnisse der Aufzuchten im nächstfolgenden Jahr wird an anderer Stelle berichtet. Es zeigte sich nun, daß die Kreuzungen ganz verschieden ansetzten. Es war naheliegend, diesbezügliche Untersuchungen durchzuführen. So wurden im Jahr 1950 die Kreuzungen möglichst oft wiederholt. Von den Kapseln wurden diejenigen mit den meisten Samen (im allgemeinen 10—11 Kapseln) ausgewählt und in üblicher Weise der Prozentsatz großer Samen, geschrumpfter Samen und des sogenannten groben Pulvers, bezogen auf den gesamten Kapselinhalt, ermittelt (s. Tabelle 1). 1951 wurden die Samen jeweils von 3, gelegentlich auch 4 Kapseln mit dem besten Ansatz zum Keimen ausgelegt. Die Keimlinge wurden pikiert. Zuletzt wurde festgestellt, wieviel von den nicht gekeimten Samen taub waren. Die Bastarde aus den verschiedenen Kreuzungen konnten zuweilen schon in den Töpfen identifiziert werden. Soweit das nicht möglich war, mußten sie ausgepflanzt werden. Sie zu beschreiben erübrigt sich. Ihre Konstitution ist aus den noch zu besprechenden Tabellen 2 und 3 ersichtlich.

Welche Formen in den Kreuzungen zu erwarten sind, ergibt sich leicht aus der nachfolgenden Übersicht (s. dazu auch Tabelle 1).

Oe. Hookeri, der eine Kreuzungspartner, ist eine Homozygote ^{h}Hook · ^{h}Hook. Durch Eizellen und Pollenkörner wird ^{h}Hook vererbt.

Von den 10 Arten der Sektion *Raimannia* sind 5 isogame Komplexheterozygoten, nämlich *Oe. Berteriana* (B · *l*), *Oe. odorata* (v · l), *Oe. stricta* (l_{str} · v_{str}), *Oe. Selowii* (l_{Se} · v_{Se}) und *Oe. mollissima* (mk · ml). Bei diesen werden durch Eizellen und Pollenkörner die in Klammern beigefügten Komplexe übertragen; bei der *Oe. Berteriana* z. B. B und *l*.

Oe. Oakesiana (k_{oak} · l_{oak}) und *Oe. campylocalyx* (ck · cl) sind halbheterogame Komplexheterozygoten, bei denen durch die Eizellen beide Komplexe vererbt werden, durch den Pollen aber nur einer, nämlich k_{oak} bzw. ck.

Oe. scabra (hsc · hsc), *Oe. argentinea* (ha · ha) und *Oe. longiflora* (hl · hl) sind Homozygoten.

Weiter wurde mit *Oe. odorata* (v · I) mit *Berteriana*-Plasma und -Plastiden als ♀ gekreuzt, um einen etwaigen Unterschied gegenüber den Kreuzungen mit der ursprünglichen v · I zu erfassen, ebenso mit l · v *Bert.*-Plasma und l · v *od.*-Plasma ♀, die, aus den B · l ♂ × v · I-Kreuzungen erhalten, seit vielen Jahren immer wieder geselbstet wurden. Hierbei mußte sich zeigen, ob die l- bzw. v-Samenanlagen durch die ^{h}Hook-Schläuche so häufig befruchtet werden wie die gleichen Samenanlagen bei der *Oe. odorata* (v · I) bzw. *Oe. Berteriana* (B · l). Deshalb wurde auch die I · I einbezogen, eine Homozygote mit dem I-Komplex der *Oe. odorata* (v · I), die mit Berteriana-Plastiden lebensfähig ist.

Die mit *Oe. Hookeri* ♀ gekreuzten B · II und l · II sind halbheterogam. Durch den Pollen wird nur der Komplex B bzw. l übertragen.

Zunächst werden die Kreuzungen mit *Oe. Hookeri* ♂ besprochen, dann die reziproken. Zuletzt sollen diese verglichen und die Ergebnisse herausgestellt werden[1].

1. Die Kreuzungen mit *Oe. Hookeri* ♂.

Wie aus der Tabelle 1 und den Kurven der Abb. 1—4 zu entnehmen ist, setzen die Kreuzungen recht unterschiedlich an. Auch bei den

Tabelle 1. *Der Samenansatz in den verschiedenen Kreuzungen.*

Lfd. Nr.	♀ bzw. ♂	Genetische Konstitution	*Oe. Hookeri* (^{h}Hook · ^{h}Hook) ♂ Kreuzungen	♂ % große Samen	♂ % geschr. Samen	♂ % grob. Pu.	♀ Kreuzungen	♀ % große Samen	♀ % geschr. Samen	♀ % grob. Pu.
1	*Oe. Berteriana*	B · l	10	10,7	—	3,9	6	22,5	3,4	0,5
2		B · II					3	7,4	0,3	0,1
		l · II					3	13,6	1,6	0,9
3	*Oe. odorata*	v · I	11	13,5	0,9	1,2	6	8,2	0,7	—
	Oe. odorata (*Bert.*-Pl.)	v · I	11	5,9	0,6	1,0				
4		l · v	11	31,2	0,1	0,8				
		l · v (*od.*-Pl.)	11	26,2	0,1	0,4				
5	*Oe. stricta*	l_{str} · v$_{str}$	11	9,6	0,2	2,1	8	13,1	2,6	—
6	*Oe. Selowii*	l_{Se} · v$_{Se}$	11	7,2	0,2	0,7	7	27,8	1,5	0,4
7	*Oe. mollissima*	mk · ml	11	1,4	0,4	0,4	10	7,9	0,7	0,1
8	*Oe. Oakesiana*	k$_{oak}$ · l$_{oak}$	11	13,8	0,3	0,3	11	13,5	5,0	0,9
9	*Oe. campylocalyx*	ck · cl	30	kein Sa.-Ansatz			10	48,2	1,3	0,1
10	*Oe. scabra*	hsc · hsc	11	61,4	0,1	—	10	75,4	4,8	0,1
11		I · I	11	17,3	0,2	0,3	11	23,6	2,4	0,2
12	*Oe. argentinea*	ha · ha	10	12,8	—	0,1	13	kein Sa.-Ansatz		
13	*Oe. longiflora*	hl · hl	11	7,9	0,3	0,6	11	5,8	1,1	0,3

[1] Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei auch an dieser Stelle für die Förderung der hier im Institut durchgeführten Untersuchungen gedankt, desgleichen dem Univ.-Bund Erlangen.

gleichen Kreuzungen sind die Schwankungen recht beträchtlich. Die Kreuzungen konnten selbstverständlich nicht alle an einem Tag gemacht werden. Die Außenbedingungen waren demzufolge verschieden und wirkten sich entsprechend aus. Aber auch der Reifezustand der Samenanlagen war ein verschiedener. So sehen wir z. B. bei den Kurven für die Kreuzungen mit $l_{str} \cdot v_{str}$ und $l_{Se} \cdot v_{Se}$ (Abb. 2), daß 2 Kapseln der letzteren mehr große Samen enthielten als die ersten

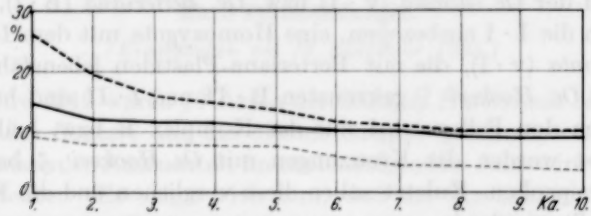


Abb. 1. —— B · *l* × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (14,8—8,6) 10,7 % gr. Sa, 0,0 % geschr. Sa, (7,7—1,1) 3,9 % gr. Pu; – – – – v · I × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (26,2—9,6) 13,5 % gr. Sa, (1,7—0,2) 0,9 % geschr. Sa, (4,1—0,4) 1,2 % gr. Pu; - - - - - - v · I (*Bert.*-Pl) × ^{h}Hook . ^{h}Hook: 9,2—3,4) 5,9 % gr. Sa, (2,6—0,2) 0,6 % geschr. Sa, (3,0—0,2) 1,0 % gr. Pu.

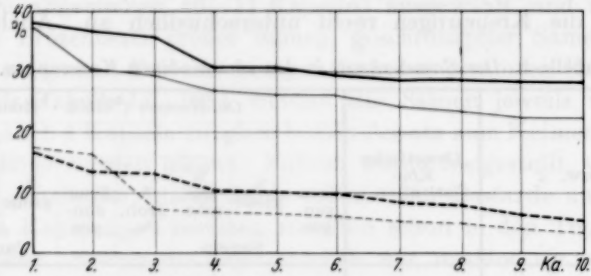


Abb. 2. —— *l* · v *Bert.*-Pl × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (38,0—27,9) 31,2 % gr. Sa, (0,4—0,0) 0,1 % geschr. Sa, (2,5—0,2) 0,8 % gr. Pu; ——— *l* · v *od.*-Pl. × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (37,4—20,0) 26,2 % gr. Sa, (0,3—0,0) 0,1 % geschr. Sa, (1,2—0,0) 0,4 % gr. Pu; – – – – $l_{str} \cdot v_{str}$ × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (16,7—4,5) 9,6 % gr. Sa, (0,4—0,0) 0,2 % geschr. Sa, (7,6—0,0) 2,1 % gr. Pu; - - - - - - - $l_{se} \cdot v_{se}$ × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (17,5—3,2) 7,2 % gr. Sa, (1,2—0,0) 0,2 % geschr. Sa, (2,3—0,0) 0,7 % gr. Pu.

beiden der $l_{str} \cdot v_{str}$-Kreuzungen, obwohl sonst der Samenansatz offensichtlich besser ist. Auch bei den beiden $l \cdot v$-Kreuzungen ist das ähnlich. Versuche mit Früh- und Spätbestäubung, über die noch zu berichten sein wird, haben ergeben, daß bei 2 Samenanlagensorten, die gewöhnlich die gleichen Pollenschläuche verschieden gut chemotropisch anziehen, der Unterschied in der Affinität kleiner werden oder sogar verschwinden kann, wenn sich die Samenanlagen in dem Zustand befinden, da sie die Pollenschläuche optimal chemotropisch anziehen. Die Kurven für die $l \cdot v$-Kreuzungen (Abb. 2) liegen aber eindeutig über denen für die $l_{str} \cdot v_{str}$ und $l_{Se} \cdot v_{Se}$, obwohl die Komplexe dieser 3 Formen, durch die Bezeichnung schon angedeutet, recht ähnlich sind. Obwohl die *Oe. mollissima* (mk · ml) und die *Oe. Oakesiana* ($k_{oak} \cdot l_{oak}$)

sich nicht sehr unterscheiden, sind die Samenansätze in den Kreuzungen recht verschieden (Abb. 3). Bei den $l \cdot$ v *Bert.*-Plasma-Kreuzungen ist der Sa.-Ans. besser als bei denen mit $l \cdot$ v *od.*-Plasma, aber bei den Kreuzungen mit den beiden v · I ist es gerade umgekehrt (Abb. 1). Der durchschnittliche Betrag für die Kreuzungen mit v · I *od.*-Plasma ist mit 13,5% wesentlich größer als bei den Kreuzungen mit v · I *Bert.*-Plasma mit 5,9%.

Vergleichen wir die Kreuzungen insgesamt, so liegen die Samenansätze zwischen 61,4% bei den hsc · hsc-Kreuzungen und 1,4% bei den mk · ml-Kreuzungen. Die Anteile an geschrumpften Samen und grobem Pulver, beide aus befruchteten Samenanlagen entstanden, müssen unberücksichtigt bleiben, z. T. sind sie beträchtlich, aber meist nur deshalb, weil sie in einzelnen Kapseln besonders groß sind.

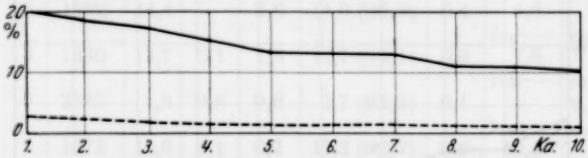


Abb. 3. —— $k_{oak} \cdot l_{oak} \times {}^{h}Hook \cdot {}^{k}Hook$: (20,3—10,1) 13,8 % gr. Sa, (0,9—0,0) 0,3 % geschr. Sa, (1,1—0,0) 0,3 gr. Pu; – – – – mk · ml × ${}^{h}Hook \cdot {}^{h}Hook$: (2,9—0,7) 1,4 % gr. Sa, (1,6—0,0) 0,4 % geschr. Sa, (1,1—0,0) 0,4 % gr. Pu; ck · cl × ${}^{h}Hook \cdot {}^{h}Hook$: kein Samenansatz.

Auffallenderweise setzten die ck · cl × *Hookeri*-Kreuzungen überhaupt nicht an, so oft sie auch gemacht wurden. Kurze Zeit nach der Bestäubung vertrocknen die Fruchtknoten und fallen ab. Dabei hat die *Oe. campylocalyx*, wie übrigens auch die *Oe. scabra*, die gleiche Form und Stellung der Kapseln wie die *Oe. Hookeri*, aber die Samen sind eiförmig.

Es war nun möglich, daß die ${}^{h}Hook$-Schläuche nicht durch den Griffel der ck · cl wachsen. Um das zu prüfen, wurden die Narben abgeschnittener Griffel aus kastrierten Blüten bestäubt. Die Schnittfläche der auf Objektträger gelegten Griffel steckte in Nährgelatine. Schon nach 4—5 Stunden hatten zahlreiche ${}^{h}Hook$-Schläuche den 5 cm langen Griffel durchwachsen. Folglich schied diese Möglichkeit aus.

Vielleicht aber ziehen die ck- und cl-Samenanlagen die ${}^{h}Hook$-Schläuche nicht chemotropisch an. Um das zu zeigen, wurden Samenanlagen der ck · cl abends einzeln auf Objektträgern, mit geeigneter Nährgelatine (s. z. B. Loerzer) überzogen, ausgelegt. Diese kamen dann in einen Thermostaten (25°). Am nächsten Morgen wurden *Hookeri*-Pollenkörner in etwa 1 mm Entfernung kreisförmig um die Samenanlage ausgelegt. Die Objektträger kamen dann wieder für 4 bis 5 Stunden in den Thermostaten. Bei der dann erfolgenden mikroskopischen Untersuchung zeigte sich, daß die Pollenschläuche ungerichtet

wuchsen, während die Schläuche bei den Kontrollversuchen mit *campylocalyx*-Pollen eindeutig auf die Samenanlagen jeweils zu wuchsen. 600 Versuche hatten alle das gleiche Ergebnis. Damit ist erklärt, warum die ck · cl × ^{h}Hook · ^{h}Hook-Kreuzungen nicht ansetzen. Dann wird man weiter schließen können, daß die Kreuzungen deshalb so unterschiedlich ansetzen, weil die Samenanlagen in Abhängigkeit von der genetischen Konstitution der Eizellen (bzw. des Embryosackes) die ^{h}Hook-Schläuche verschieden gut anziehen.

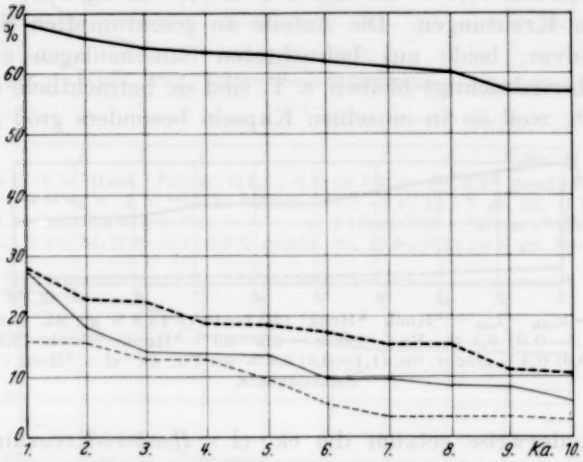


Abb. 4. ——— hsc · hsc × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (68,2—56,7) 61,4 % gr. Sa, (0,9—0,1) 0,1 % geschr. Sa, 0,0 % gr. Pu; – – – – I · I × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (28,2—10,5) 17,3 % gr. Sa, (0,8—0,0) 0,2 % geschr. Sa, (1,5—0,0) 0,3 % gr. Pu; ——— ha · ha × ^{h}Hook · ^{h}Hook: 27,5—5,9) 12,8 % gr. Sa, 0,0 % geschr. Sa, (in 4 Ka) 0,1 % gr. Pu; · · · · · · hl · hl × ^{h}Hook · ^{h}Hook: (15,9—2,5) 7,9 % gr. Sa, (1,1—0,0) 0,3 % geschr. Sa, (2,5—0,0) 0,6 % gr. Pu.

In den Kreuzungen mit den Homozygoten (Abb. 4) wäre der Samenansatz als solcher ein Zeichen für die unterschiedliche Affinität zwischen den verschiedenen Samenanlagen und den *Hookeri*-Schläuchen, allerdings unter der Voraussetzung, daß der Anteil an fertilen Samenanlagen der gleiche ist. Das ist aber, um es vorwegzunehmen, nicht der Fall. Die Kreuzungen mit den Heterozygoten mußten aufgezogen werden, um die Affinitäten bestimmen zu können. Vergleichsweise geschah das auch mit den anderen.

Alle Aufzuchten sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Aus der Spalte „Gesamter Kapselinhalt" der 3, einmal der 5 Kapseln ist zu entnehmen, wie verschieden groß dieser ist. Auf ihn sind alle Prozentsätze bezogen. Die eingeklammerten Zahlen in der Spalte „Gekeimt" geben an, wieviel Prozent, bezogen auf die ausgelegten Samen = 100, gekeimt haben. Die Keimung war durchweg sehr gut. Taube Samen sind es wenige. Der etwas höhere Anteil an diesen in den hsc · hsc ×

Tabelle 2. *Die Aufzuchten der Kreuzungen mit Oe. Hookeri* ♂♂.

Lfd. Nr.	♀	Aufzuchten	Gesamter Ka.-Inh.	Große Sa. %	Geschr. Sa. %	Grob. Pu. %	Gekeimt %	Taube Sa. %	Prozent	Prozent	Abweicher %	Samen	Ausfall
1	B · *l*	3	1951	12,9	—	5,1	12,2 (94,3)	0,7	B · — 4,3 v · —	*l* · — 7,4 I · —	—	11,7	0,5
3	v · I	3	1351	20,6	0,3	1,0	19,9 (94,1)	0,4	12,4	7,2	0,1	19,7	0,2
	v · I (*Bert.*-Pl.)	3	1358	8,3	1,1	0,9	7,3 (89,2)	0,7	3,5 *l* · —	3,2 v · —	—	6,7	0,6
4	*l* · v (*Bert.*-Pl.)	3	1492	36,8	0,1	1,6	34,7 (94,4)	1,2	14,9	18,7	—	33,6	1,1
„	*l* · v (*od.*-Pl.)	3	1675	32,3	0,1	0,4	31,3 (96,7)	0,5	15,5 l_{str} · —	15,2 v_{str} · —	—	30,7	0,5
5	l_{str} · v_{str}	3	1362	14,4	—	3,6	14,0 (96,9)	0,4	5,8 l_{Se} · —	7,7 v_{Se} · —	—	13,5	0,5
6	l_{Se} · v_{Se}	3	1630	13,7	0,1	1,8	12,7 (93,1)	0,9	7,6 mk · —	4,4 ml · —	—	12,0	0,7
7	mk · ml	5	3385	1,8	0,8	0,6	1,7 (93,9)	0,1	— k_{oak} · —	1,4 l_{oak} · —	—	1,4	0,3
8	k_{oak} · l_{oak}	3	1672	18,6	0,1	0,1	17,3 (92,7)	0,6	10,1 hsc · —	4,8	—	14,9	2,4
10	hsc · hsc	3	3874	66,1	—	—	63,4 (95,9)	2,7	63,4 I · —	—	—	63,4	—
11	I · I	3	1627	24,3	0,2	0,2	22,8 (94,1)	1,1	21,8 ha · —	—	—	21,8	1,0
12	ha · ha	3	922	19,9	0,1	0,3	19,8 (99,7)	0,1	19,3 hl · —	—	—	19,3	0,5
13	hl · hl	3	1666	14,8	0,4	0,7	14,1 (95,0)	0,4	10,0	—	—	10,0	4,1

Hookeri-Kreuzungen ist nicht genetisch bedingt. In diesen können ja nur hsc · ^{h}Hook auftreten. Auch der Ausfall ist im allgemeinen sehr gering.

Bemerkenswert ist zunächst, daß in den mk · ml-Kreuzungen die mk · ^{h}Hook fehlen. Das war auch in den Aufzuchten des Jahres zuvor der Fall. Die mk-Samenanlagen ziehen die ^{h}Hook-Schläuche nicht chemotropisch an. Vielfach sind die Anteile der in einer Kreuzung möglichen beiden Formen recht verschieden. So kommen in den B · *l* ♀-Kreuzungen auf 4,3% B · ^{h}Hook 7,4% *l* · ^{h}Hook, in den k_{oak} · l_{oak}-Kreuzungen gar auf 10,1% k_{oak} · ^{h}Hook nur 4,8% l_{oak} · ^{h}Hook. Daraus können wir entnehmen, wie verschieden stark die hinsichtlich ihrer Eizelle verschieden konstituierten Samenanlagen in einem Fruchtknoten die ^{h}Hook-Schläuche anziehen. Die verschiedenen Kreuzungen sollen hier nicht miteinander verglichen werden. Das wird später auf einer anderen Grundlage geschehen.

2. Die Kreuzungen mit *Oe. Hookeri* ♀.

Auch diese setzten bei großen Schwankungen innerhalb jeder Kreuzung (Abb. 5—8) recht unterschiedlich an (s. Tabelle 1). 75,4% große

Samen wurden bei den Kreuzungen mit *Oe. scabra* ♂♂ gezählt, nur 5,8% bei denen mit *Oe. longiflora*. Aus den Kreuzungen mit *Oe. argentinea* (ha · ha) wurde in Bestätigung der Versuche von Kistner nicht ein Samen erhalten; bei den reziproken Kreuzungen waren es 12,8% gewesen. Die ^{h}Hook-Samenanlagen ziehen also die ha-Schläuche nicht chemotropisch an, gleich wie die ck- und cl-Samenanlagen nicht die ^{h}Hook-Schläuche. Demgegenüber waren es in den *Hookeri* × ck · cl-Kreuzungen 48,2% große Samen. Die ^{h}Hook-Samenanlagen werden also durch die ck-Schläuche reichlich befruchtet. Die gleichen Unterschiede haben wir hinsichtlich der B · v bei den reziproken Kreuzungen B · $l \overset{\times}{\times}$ v · I.

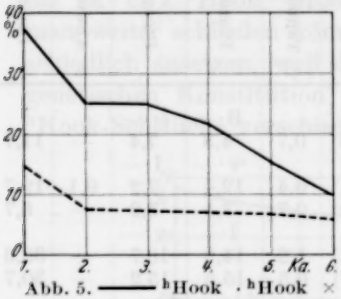


Abb. 5. ——— ^{h}Hook · ^{h}Hook × B · *l*: (37,9—9,9) 22,5 % gr. Sa, (13,9—0,0) 3,4 % geschr. Sa (1,2—0,3) 0,5 % gr. Pu; – – – – ^{h}Hook · ^{h}Hook × v. I (14,9—5,6) 8,2 % gr. Sa, (1,1—0,3) 0,7 % geschr. Sa, 0,0 % gr. Pu.

Der durchschnittliche Samenansatz bei den *Hookeri* × B · *l*-Kreuzungen war 22,5%, bei denen mit B · II ♂ und *l* · II ♂ 7,4% und 13,6%. Durch den Pollen wird das eine Mal nur der B-Komplex, das andere Mal nur der *l*-Komplex übertragen. Die Affinitäten ^{h}Hook—B und ^{h}Hook—*l* sind recht verschieden. Wenn der Samenansatz durch die Affinitäten zwischen Samenanlagen und Pollenschläuchen bestimmt ist, so muß dieser bei den *Oe. Hook* × B · *l*-Kreuzungen, bei welchen durch den Pollen der B- und *l*-Komplex übertragen wird, gleich der Summe der Prozentsätze für große Samen bei den *Hookeri* × B · II- und *Hookeri* × *l* · II-Kreuzungen sein. Diese ist 7,4 + 13,6 = 22,0%. 22,5% große Samen waren es bei den *Hookeri* × B · *l*-Kreuzungen. Dabei sind allerdings die Anteile an geschrumpften Samen außer Betracht geblieben. Berücksichtigen wir diese, so wurden bei *Hookeri* × B · *l* insgesamt 25,9% Samenanlagen befruchtet, bei den beiden anderen zusammen 22,9%. Die Übereinstimmung ist jetzt nicht mehr so gut; aber das ist bei nur je 3 B · II- und *l* · II-Kreuzungen schließlich nicht anders zu erwarten. Jedenfalls ist es doch wohl so, daß die Affinitäten ^{h}Hook—B und ^{h}Hook—*l* jeweils

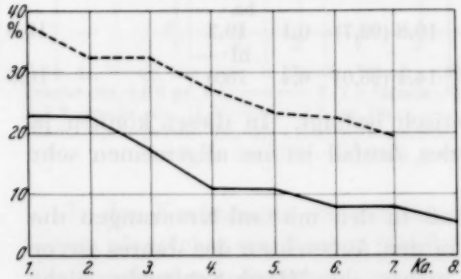


Abb. 6. ——— ^{h}Hook · ^{h}Hook × l_{str} · v_{str}: (22,6—5,2) 13,1 % gr. Sa, (13,1—0,5) 2,6 % geschr. Sa, 0,0 % gr. Pu; – – – – ^{h}Hook · ^{h}Hook × l_{se} · v_{se}: (37,8–19,4) 27,80 % gr. Sa, (4,0—0,4) 1,5 % geschr. Sa, (1,5—0,0) 0,4 % gr. Pu.

die gleichen sind, gleichgültig ob der B-Komplex von der B · *l* oder B · II, der *l*-Komplex von der B · *l* oder der *l* · II stammt.

Die *Oe. Hookeri* × *Selowii*-Kreuzungen setzen besser an als die *Oe. Hookeri* × *stricta*-Kreuzungen (s. Abb. 6). Bei den reziproken Kreuzungen war es umgekehrt gewesen.

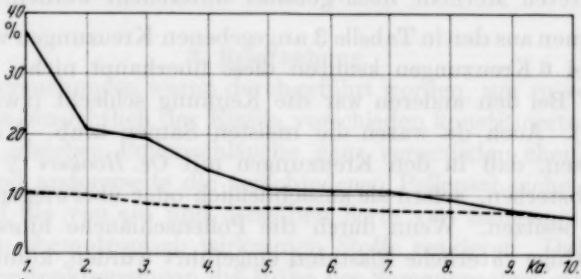


Abb. 7. ——— ^{h}Hook · ^{h}Hook × k_{oak} · l_{oak}: (37,3—5,8) 13,5 % gr. Sa, (12,1—1,1) 5,0 % geschr. Sa, (3,9—0,0) 0,9 % gr. Pu; – – – – ^{h}Hook · ^{h}Hook × mk · ml: (10,5—6,2) 7,9 % gr. Sa, (3,3—0,0) 0,7 % geschr. Sa, (in 4 Ka) 0,1 % gr. Pu.

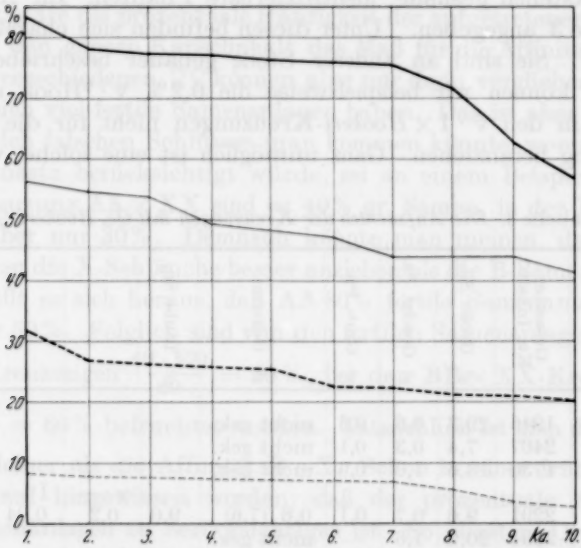


Abb. 8. ——— ^{h}Hook · ^{h}Hook × hss · hsc: (83,3—56,5) 75,4 % gr. Sa, (6,9—1,3) 4,8 % geschr. Sa, (0,3—0,0) 0,1 gr. Pu; ——— ^{h}Hook · ^{h}Hook × ck · cl: (56,4—41,2) 48,2 % gr. Sa, (3,3—0,0) 1,3 % geschr. Sa, (0,3—0,0) 0,1 % gr. Pu; – – – – ^{h}Hook · ^{h}Hook × I · I: (31,7—17,8) 23,6 % gr. Sa, (5,9—1,0) 2,4 % geschr. Sa, (0,3—0,0) 0,2 % gr. Pu; - - - - - - - ^{h}Hook · ^{h}Hook × hl · hl: (7,5—1,5) 5,8 % gr. Sa, (5,2—0,1) 1,1 % geschr. Sa, (1,0—0,0) 0,3 % gr. Pu; ^{h}Hook · ^{h}Hook × ha · ha: Kein Samenansatz.

Die *Oe. Hookeri* × *Oakesiana*--Kreuzungen setzten bei sehr großen Schwankungen besser an als die *Oe. Hookeri* × *mollissima*-Kreuzungen (Abb. 7). So war es auch bei den reziproken Kreuzungen gewesen.

Die Kurven der Abb. 8 für die Kreuzungen, bei denen durch den Pollen jeweils nur ein Komplex vererbt wird, zeigen, wie verschieden die Samenansätze sind. Die verschiedenen Pollenschläuche reagieren auf die von den *Hookeri*-Samenanlagen ausgeschiedenen chemotropisch wirksamen Stoffe ganz verschieden. Das könnte mit der von Schneider ausgearbeiteten Methode noch genauer untersucht werden.

Die Samen aus den in Tabelle 3 angegebenen Kreuzungen wurden ausgelegt. Bei 6 Kreuzungen keimten diese überhaupt nicht. Sie waren alle taub. Bei den anderen war die Keimung schlecht (zwischen 11,0 und 3,0%). Auch da waren die meisten Samen taub. Kistner hat nachgewiesen, daß in den Kreuzungen mit *Oe. Hookeri* ♀♀ die Embryonen absterben, sofern sie ausschließlich oder überwiegend *Hookeri*-Plastiden besitzen. Wenn durch die Pollenschläuche hinreichend ergrünungsfähige väterliche Plastiden eingeführt wurden, können sich die Embryonen normal entwickeln. Die Samen mit diesen keimen. Die Keimlinge sind vielfach anfänglich gescheckt. Das kann sich verlieren, und es entstehen gesunde, identifizierbare Pflanzen. Ihr Anteil ist in der Tabelle 3 angegeben. Unter diesen befinden sich charakteristische Abweicher. Sie sind an anderer Stelle genauer beschrieben worden. Jedenfalls können wir beispielsweise die 0,2% $v \cdot {}^{h}$Hook und 0,04% $I \cdot {}^{h}$Hook in den $v \cdot I \times$ *Hookeri*-Kreuzungen nicht für die Affinitätsbestimmung heranziehen. Ganz unmöglich ist eine solche, wenn über-

Tabelle 3. *Die Aufzuchten der Kreuzungen mit Oe. Hookeri* ♀♀.

Lfd. Nr.	♂	Aufzuchten	Gesamter Ka.-Inhalt	Große Sa. %	Geschr. Sa. %	Grob. Pu. %	Gekeimt %	Taube Sa. %			Abweicher %	Sa.	Ausfall
1	$B \cdot l$	3	1946	29,3	0,6	0,6	nicht gek.						
2	$B \cdot II$	3	2407	7,4	0,3	0,1	nicht gek.						
	$l \cdot II$	3	1730	13,6	1,6	0,9	nicht gek.						
3	$v \cdot I$	3	2291	9,6	0,7	0,1	0,6 (7,6)	9,0	$v \cdot$— 0,2	$I \cdot$— 0,04	(0,08)	0,24	0,36
5	$l_{str} \cdot v_{str}$	3	2031	20,9	1,6	—	nicht gek.						
6	$l_{Se} \cdot v_{Se}$	3	2110	34,2	1,2	0,2	nicht gek.						
7	$mk \cdot ml$	4	2522	8,7	1,2	0,1	0,6 (7,1)	8,0	mk.- —	ml-. 0,4	(0,2)	0,4	0,2
8	$k_{oak} \cdot l_{oak}$	3	1970	25,7	1,6	—	0,8 (3,0)	24,8	k_{oak}.- 0,7	l_{oak}-. —	(0,4)	0,7	0,1
9	$ck \cdot cl$	4	3205	53,5	1,0	0,1	2,6 (4,8)	50,7	ck·— 1,8		(0,7)	1,8	0,8
10	$hsc \cdot hsc$	3	2666	79,5	2,4	0,1	8,8 (11,0)	70,7	hsc.— 6,7		(2,2)	6,7	2,1
11	$I \cdot I$	3	2327	28,2	2,1	0,8	nicht gek.						
13	$hl \cdot hl$	4	2807	7,7	0,6	0,1	0,7 (9,3)	6,9	hl·— 0,1		—	0,1	0,6

haupt kein Samen keimt. Dabei wäre es doch erwünscht gewesen, die Affinitäten aus den verschiedenen reziproken Kreuzungen miteinander zu vergleichen. Auffallend ist, daß auch in den *Hookeri* × *mollissima*-Kreuzungen die mk · ^{h}Hook fehlen. Die ^{h}Hook-Samenanlagen ziehen also die mk-Schläuche nicht an, gleichwie die mk-Samenanlagen nicht die ^{h}Hook-Schläuche (s. Tabelle 2, lfd. Nr. 7).

3. Besprechung.

Die Untersuchungen waren durchgeführt worden, um zu zeigen, wie einerseits die hinsichtlich der Eizelle verschieden konstituierten Samenanlagen die gleichen Pollenschläuche ganz verschieden chemotropisch anziehen, und andererseits die verschiedenen Pollenschäuche ganz verschieden auf die von ein und derselben Sorte von Samenanlagen ausgeschiedenen chemotropisch wirksamen Stoffe reagieren. Dabei würde bei Homozygotenkreuzungen die Höhe des Samenansatzes ein Maß für die Affinitäten zwischen Samenanlagen und Pollenschläuchen sein; bei Heterozygotenkreuzungen, mit den Homozygotenkreuzungen nicht vergleichbar, wäre die prozentuale Häufigkeit der aufgetretenen Formen, bezogen auf den ganzen Kapselinhalt das Maß für die Affinität. Kreuzungen mit verschiedenen ♀♀ können aber nur dann verglichen werden, wenn sie gleich viel fertile Samenanlagen haben. Das ist aber nicht der Fall. Zu welch falschen Schlüssen man kommen könnte, wenn lediglich der Samenansatz berücksichtigt würde, sei an einem Beispiel gezeigt. In einer Kreuzung AA × XX sind es 40% gr. Samen, in der Kreuzung BB × XX aber nur 30%. Demnach könnte man meinen, daß die A-Samenanlagen die X-Schläuche besser anziehen als die B-Samenanlagen. Hernach stellt es sich heraus, daß AA 80% fertile Samenanlagen hat, BB aber nur 50%. Folglich sind von den fertilen Samenanlagen bei den AA × XX-Kreuzungen $\frac{40 \cdot 100}{80} = 50\%$, bei den BB × XX-Kreuzungen aber $\frac{30 \cdot 100}{50} = 60\%$ befruchtet worden. Tatsächlich ist also die Affinität A—X kleiner als die Affinität B—X. Schon in einer früheren Arbeit ist darauf hingewiesen worden, daß der prozentuale Anteil an fertilen Samenanlagen zu berücksichtigen ist. So günstige Objekte die *Oenotheren* in mancherlei Hinsicht sind, so ist gerade die unterschiedliche Fertilität recht hinderlich. Dabei ist es ungemein schwierig, diese zu bestimmen. Dafür kann einmal der ganze Kapselinhalt fixiert, eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten werden. Solche mühseligen Untersuchungen haben Schütz, Weidner, v. Zitek, Kistner, Huber und Leuchtmann durchgeführt. Dabei ist die große Gefahr, daß ein Teil der kleinen Samenanlagen verloren geht. Sicher ist, daß der prozentuale Anteil sehr schwankt, bei der *Oe. Berteriana* beispielsweise zwischen 50 und 70%. Selbstverständlich konnte der Anteil an

fertilen Samenanlagen auch durch Kreuzungen ermittelt werden. Aber man findet kaum einen ♂ Kreuzungspartner, dessen Pollenschläuche auch bei günstigsten Verhältnissen immer alle Samenanlagen befruchten. Selbst bei den *Oe. Hookeri* × hsc · hsc-Kreuzungen (Abb. 8) wird das nicht der Fall gewesen sein. Zudem ist zu erwarten, daß in den verschiedenen Jahren der durchschnittliche Prozentsatz nicht immer der gleiche ist.

Tabelle 4. *Die Affinitäten in den Kreuzungen mit Oe. Hookeri ♂♂.*

♀	Fertile Sa.-Anl. %	Affinitäten bezogen auf		Ges. Ka.-Inh.	fertile Sa.-Anlagen
B · *l*	50—60	B— ^{h}Hook		4,3	17,2—14,3
		l—	„	7,4	29,6—24,7
v · I	50—60	v—	„	12,4	49,6—41,3
		I—	„	7,2	28,8—24,0
v · I	50—60	v—	„	3,5	14,0—11,7
(*Bert.*-Pl.)		I—	„	3,2	12,8—10,7
l · v	50—60	*l*—	„	14,9	59,6—49,7
(*Bert.*-Pl.)		v—	„	18,7	74,8—62,3
l · v	50—60	*l*—	„	15,5	62,0—51,7
(*od.*-Pl.)		v—	„	15,2	60,8—50,7
l_{str} · v_{str}	40—50	l_{str}—	„	5,8	29,0—23,2
		v_{str}—	„	7,7	38,5—30,8
l_{Se} · v_{Se}	40—50	l_{Se}—	„	7,6	38,0—30,4 (24,5—19,6)
		v_{Se}—	„	4,4	22,0—17,6
mk · ml	40—60	ml—	„	1,8	9,0—6,0
		mk—	„	0,0	0,0
k_{oak} · l_{oak}	40—60	k_{oak}—	„	10,1	50,5—33,7
		l_{oak}—	„	4,8	24,0—16,0
ck · cl		ck—	„	0,0	0,0
		cl—	„	0,0	0,0
hsc · hsc	70—80	hsc—	„	66,1	94,4—82,6
I · I	60—80	I—	„	24,3	40,5—30,4
ha · ha	100	ha—	„	19,9	27,5—14,1
hl · hl	70—80	hl—	„	14,8	21,1—18,5

In der Tabelle 4 sind in der gleichen Reihenfolge wie in der Tabelle 2 die ♀♀ der Kreuzungen mit *Oe. Hookeri* ♂♂ aufgeführt. In der 2. Spalte sind die durch Kreuzungen und mikroskopische Untersuchungen ermittelten prozentualen Anteile an fertilen Samenanlagen angegeben, in der nächsten die aufgezogenen, in Kreuzungen aufgetretenen Formen und deren prozentuale Häufigkeit bezogen auf den ganzen Kapselinhalt. Sofern, wie in den Kreuzungen mit mk · ml ♀ oder in denen mit den Homozygoten, nur ein Typ vorhanden ist, wurde der Prozentsatz an großen Samen bei den 5 bzw. 3 besten Kapseln genommen. All diese Zahlen sind schon in der Tabelle 2 angegeben. In der letzten Spalte ist berechnet wieviel der fertilen Samenanlagen durch ^{h}Hook-Schläuche befruchtet wurden. Beispielsweise sind von den 50% fertilen Samenanlagen der B · *l* 25% B- und 25% *l*-Samenanlagen. B · ^{h}Hook waren es 4,3%, *l* · ^{h}Hook 7,4%. Demzufolge sind von den 25% B-Samenanlagen $\frac{4{,}3 \cdot 100}{25} = 17{,}2\%$, von den 25% *l*-Samenanlagen $\frac{7{,}4 \cdot 100}{25} = 29{,}6\%$ befruchtet worden. In der gleichen Weise sind auch die anderen Werte der letzten Spalte berechnet worden. Diese geben die Affinität der verschieden konstituierten Samenanlagen zu den *Hookeri*-Schläuchen an. Das Maß für diese ist hier ein anderes als in

früheren Arbeiten. Jedenfalls können nunmehr alle Kreuzungen miteinander verglichen werden. Das soll nachfolgend geschehen. Die Abb. 1—4 sind dabei mit heranzuziehen.

In den B · *l* × *Hookeri*-Kreuzungen ziehen die *l*-Samenanlagen die *Hookeri*-Schläuche besser an als die B-Samenanlagen.

Der Samenansatz bei den v · I × *Hookeri*-Kreuzungen ist bei fünf besser als bei den vorhergehenden (s. Abb. 1), weil die Affinität v—^{h}Hook größer ist als *l*—^{h}Hook; die Affinitäten *l*—^{h}Hook und I—^{h}Hook sind gleich. Wenn in den anderen Kreuzungen kaum mehr ein Unterschied vorhanden ist, wird das dadurch bedingt sein, daß die Affinität v—^{h}Hook infolge anderer äußerer und innerer Bedingungen auf den Wert von *l*—^{h}Hook absinkt. Um diese Annahme zu bestätigen, hätten die Samen aus den Kapseln 7—9 ausgelegt werden müssen. Es wäre vielleicht überhaupt besser, nicht die Kapseln mit dem höchsten Samenansatz für die Aufzuchten zu verwenden.

Auffallenderweise ist der Samenansatz bei den Kreuzungen mit v · I *Bert.*-Plasma mit 5,9% sehr viel geringer (Abb. 1). Die v- und I-Samenanlagen werden durch die ^{h}Hook-Schläuche etwa gleich häufig befruchtet, aber beide viel seltener als bei den Kreuzungen mit der ursprünglichen *Oe. odorata*. Ein Einfluß des Plasmas auf die Affinität ist auch sonst gefunden worden.

Bei den *l* · v *Bert.*-Plasma ist der Ansatz mit 31,1% großen Samen überraschend hoch (Abb. 2). Die *l*-Samenanlagen werden hier viel häufiger befruchtet (59,6—49,7%) als die *l*-Samenanlagen der B · *l* (29,6—24,7%). Noch größer ist der Unterschied bei den v-Samenanlagen der *l* · v *Bert.*-Plasma und der v · I *Bert.*-Plasma: 74,8—62,3% gegenüber nur 14,0—11,7%. Das ist sehr auffallend. Offenbar ist es nicht gleichgültig, ob die gleich konstituierten Samenanlagen im Fruchtknoten dieses oder jenes Diplonten enthalten sind. Ihr chemotropisches Anziehungsvermögen kann verschieden sein. Eine Erklärung dafür kann zunächst nicht gegeben werden. Von hier aus könnte man die merkwürdige Tatsache verstehen, daß die B · v aus den v · $I^{\times}_{\times}$ B · *l*-Kreuzungen so auffallend schlecht ansetzen. Bei dieser Komplexheterozygote sind wohl die Affinitäten der B- und v-Samenanlagen zu den verschiedenen Pollenschläuchen gegenüber sonst stark erniedrigt. In diesem Zusammenhang sei noch darauf hingewiesen, daß, wie früher ausgeführt, die Affinitäten ^{h}Hook—B und ^{h}Hook—*l* dieselben sind, gleichgültig ob der B- bzw. *l*-Pollen von der B · *l* oder der B · II und *l* · II stammt. Vielleicht ist eine Änderung der Affinitäten nur dann zu finden, wenn Komplexheterozygoten mit den Komplexen der Ausgangsformen — bei der *l* · v dem *l*-Komplex der *Oe. Berteriana* und dem v-Komplex der *Oe. odorata* — als ♀♀ verwendet werden. Das könnte geprüft werden.

Bei den Kreuzungen mit $l_{str} \cdot v_{str}$ ♀♀ ist der Samenansatz mit 9,6% sehr viel geringer als bei denen mit $l \cdot v$ *Bert.*-Plasma mit 31,1% (s. Tabelle 1, Abb. 2). Es werden auch von den l_{str}-Samenanlagen nur 29,0— 23,2%, von den v_{str}-Samenanlagen 38,5—30,8% befruchtet. In beiden Kreuzungen ist die Affinität v—^{h}Hook größer als l—^{h}Hook.

Bei den Kreuzungen mit $l_{Se} \cdot v_{Se}$ wurden i. D. 7,2% große Samen gezählt (s. Abb. 2), also weniger als in den Kreuzungen mit $l_{str} \cdot v_{str}$. Der Unterschied wäre noch größer, wenn nicht 2 Kapseln besonders viel Samen enthalten hätten. Bei den 3 Aufzuchten waren die $v_{Se} \cdot {}^{h}$Hook weniger häufig als die $v_{str} \cdot {}^{h}$Hook. Von den v_{Se}-Samenanlagen sind auch nur 22,0—17,6%, von den v_{str}-Samenanlagen aber 38,5—30,8% befruchtet worden. Der gute Samenansatz bei den beiden ersten Kapseln ist durch eine erhebliche Zunahme der $l_{Se} \cdot {}^{h}$Hook bedingt, die häufiger sind als in den beiden $l_{str} \cdot v_{str}$-Kreuzungen. Bei den Aufzuchten aus Samen der Kapsel 3 sinkt der Anteil auf 4,9% gegenüber 9,5% und 8,5% bei den beiden anderen ab. In diesem Fall sind von den l_{Se}-Samenanlagen 24,5—19,6% (die Werte sind in der Tabelle 4 in Klammern beigefügt) befruchtet worden, also etwas weniger als bei den $l_{str} \cdot v_{str}$-Kreuzungen. Wenn die $l_{Se} \cdot v_{Se}$-Kreuzungen schlechter ansetzten, so ist das in erster Linie dadurch bedingt, daß die Affinität v_{Se}—^{h}Hook geringer ist als v_{str}—^{h}Hook. Die Affinität l_{Se}—^{h}Hook ist wohl so groß wie l_{str}—^{h}Hook, vielleicht auch etwas kleiner. Wenn es in zwei $l_{Se} \cdot v_{Se} \times$ *Hookeri*-Kreuzungen so auffallend viel $l_{Se} \cdot {}^{h}$Hook waren, so ist das nach anderen, noch nicht veröffentlichten Untersuchungen verständlich. Die l-Samenanlagen ziehen in einem optimalen, selten erwischten Reifezustand die Pollenschläuche besonders gut an.

Die mk · ml-Kreuzungen mit 1,4% großen Samen setzen viel schlechter an als die $k_{oak} \cdot l_{oak}$-Kreuzungen mit 13,8% großen Samen (s. Abb. 3). Die mk-Samenanlagen werden überhaupt nicht befruchtet, die ml-Samenanlagen zu nur 9,0—6,0%. Bei den $k_{oak} \cdot l_{oak}$-Kreuzungen sind die Affinitäten mit k_{oak}—^{h}Hook = 50,5—33,7 und l_{oak}—^{h}Hook = 24,0—16,0 sehr verschieden und verhältnismäßig hoch.

Bei den ck · cl-Kreuzungen ziehen, wie nachgewiesen wurde, weder die ck- noch die cl-Samenanlagen die *Hookeri*-Schläuche an.

Die Kreuzungen mit den Homozygoten hsc · hsc, I · I und hl · hl ♀♀ setzten recht unterschiedlich an (s. Abb. 4). Ihre Samenanlagen ziehen die *Hookeri*-Schläuche verschieden gut an. Das ist zwar aus den Abbildungen schon ablesbar, aber da die ha · ha lauter fertile Samenanlagen besitzt, die I · I aber nur 60—80%, entsprechen die Werte der Tabelle 4 mehr den tatsächlichen Verhältnissen. Besonders auffällig ist, daß die I-Samenanlagen der I · I mit *Bert.*-Plasma zu 40,5—30,4% befruchtet werden, bei der v · I *Bert.*-Plasma aber zu nur 12,8—10,7%.

In der Tabelle 5 sind die Prozentsätze der befruchteten fertilen Samenanlagen nach fallenden Werten angeordnet. Es ist überraschend, wie fein abgestuft diese sind und in wie weiten Grenzen sie variieren. Am leichtesten wäre das verständlich, wenn die Samenanlagen je nach der genetischen Konstitution der Eizelle bzw. des Embryosackes einen ihr gemäßen chemotropisch wirksamen Stoff produzierten. Man müßte versuchen, diesen, wenigstens für die Homozygoten, näher zu bestimmen. Auffallend ist aber, daß dieselben Samenanlagen je nach ihrer Herkunft so verschieden häufig befruchtet werden. Darauf wurde schon oben hingewiesen. Die nachfolgende Zusammenstellung (Tabelle 6) zeigt das aber am besten. Die $l_{str} \cdot v_{str}$ und $l_{Se} \cdot v_{Se}$ wurden mit einbezogen, weil die genetische Analyse ergab, daß die deshalb entsprechend bezeichneten *l*- und v-Komplexe sich von dem *l*-Komplex der *Oe. Berteriana* (B · *l*) bzw. dem v-Komplex der *Oe. odorata* (v · I) nicht sehr unterscheiden. Die Affinitäten der verschiedenen *l*-Samenanlagen zu den ^{h}Hook-Schläuchen sind auch tatsächlich nicht sehr verschieden, wohl aber die der v-Samenanlagen, auch wenn wir die beiden *l* · v unberücksichtigt lassen.

Tabelle 5. *Die Affinitäten (= % befruchteter fertiler Samenanlagen) in den Kreuzungen mit Oe. Hookeri ♂♂, nach fallenden Werten angeordnet.*

♀	Die Affinität = % befrucht. fert. Sa.-Anl.		Lfd. Nr.
hsc · hsc	hsc— ^{h}Hook	94,4—82,6	1
I · v *Bert.*-Pl.	v— „	74,8—62,3	2
l · v *od.*-Pl.	*l*— „	62,0—51,7	3
l · v *od.*-Pl.	v— „	60,8—50,7	4
l · v *Bert.*-Pl.	*l*— „	59,6—49,7	5
$k_{oak} \cdot l_{oak}$	k_{oak}— „	50,5—33,7	6
v · I *od.*-Pl.	v— „	49,6—41,3	7
I · I *Bert.*-Pl.	I— „	40,5—30,4	8
$l_{str} \cdot v_{str}$	v_{str}— „	38,5—30,8	9
($l_{Se} \cdot v_{Se}$)	(l_{Se}— „)	(38,0—30,4)	
B · *l*	*l*— „	29,6—24,7	10
$l_{str} \cdot v_{str}$	l_{str}— „	29,0—23,2	11
v · I *od.*-Pl.	I— „	28,8—24,0	12
ha · ha	ha— „	27,5—14,1	13
$l_{Se} \cdot v_{Se}$	l_{Se}— „	24,5—19,6	14
$k_{oak} \cdot l_{oak}$	l_{oak}— „	24,0—16,0	15
$l_{Se} \cdot v_{Se}$	v_{Se}— „	22,0—17,6	16
hl · hl	hl— „	21,1—18,5	17
B · *l*	B— „	17,2—14,3	18
v · I *Bert.*-Pl.	v— „	14,0—11,7	19
v · I *Bert.*-Pl.	I— „	12,8—10,7	20
mk · ml	ml— „	9,0—6,0	21
ck · cl	ck— „	0,0	22
ck · cl	cl— „	0,0	23
mk · ml	mk— „	0,0	24

Tabelle 6. *Vergleich der Affinitäten (= % befruchteter fertiler Samenanlagen) v—^{h}Hook, I—^{h}Hook, l—^{h}Hook in den Kreuzungen mit Oe. Hookeri ♂♂.*

♀	v	I	*l*
v · I *od.*-Pl.	49,6—41,3	28,8—24,0	
v · I *Bert.*-Pl.	14,0—11,7	12,8—10,7	
I · I *Bert.*-Pl.		40,5—30,4	
l · v *Bert.*-Pl.	74,8—62,3		59,6—49,7
l · v *od.*-Pl.	60,8—50,7		62,0—51,7
B · *l*			29,6—24,7
$l_{str} \cdot v_{str}$	38,5—30,8		29,0—23,2
$l_{Se} \cdot v_{Se}$	22,0—17,6		24,5—19,6

Auch für die *Oe. Hookeri* ♀♀-Kreuzungen wurden die Prozentsätze befruchteter fertiler Samenanlagen berechnet. Es wurde angenommen, daß die *Oe. Hookeri* 80—85% fertile Samenanlagen besitzt. Kistner fand bei ihren

Untersuchungen 78,6%, und die *Oe. Hookeri* × hsc · hsc-Kreuzungen (Abb. 7) stehen dem nicht entgegen. Die Anordnung in der Tabelle 7 ist die gleiche wie bei Tabelle 4. Bei den *Oe. Hookeri* × B · *l*-Kreuzungen wurden bei einem durchschnittlichen Samenansatz von 22,5% von den fertilen Samenanlagen 28,1—26,0% befruchtet. Wieviel es B · ^{h}Hook und *l* · ^{h}Hook waren, ließ sich nicht feststellen, da alle Samen taub waren. Um die Affinitäten ^{h}Hook—B und ^{h}Hook—*l* zu bestimmen, wurde mit den halbheterogamen B · II und *l* · II ♂♂ gekreuzt. Bei 7,4% bzw. 13,6% großen Samen wurden 9,3—8,7% bzw. 17,0—16,0% der fertilen Samenanlagen befruchtet. Die Affinitäten sind recht verschieden. Die Werte bei Kistner sind 10,7 und 12,9, hier bezogen auf den ganzen Kapselinhalt. Bei den v · I-Kreuzungen mit 9,6% großen Samen wurden 12,0 bis 11,3% der fertilen Samenanlagen befruchtet. Kistner hat auch die Kreuzungen *Oe. Hookeri* × Typ A hergestellt. Bei dieser trisomen Mutante wird durch den Pollen nur der v-Komplex vererbt. 4,2% ^{h}Hook · v waren es. Demnach wurden nur 5,2—4,9% der fertilen Samenanlagen befruchtet. Für die Affinität ^{h}Hook—I wären die Differenzen von 6,8—6,4% die errechneten Werte.

Tabelle 7. *Die Affinitäten in den Kreuzungen mit Oe. Hookeri ♀♀ (mit 80—85% fertilen Samenanlagen).*

♂	Affinitäten bezogen auf	gesamten Ka.-Inhalt	fertile Sa.-Anl.
B · *l*	durchschnittl.	22,5	28,1—26,4
B · II	^{h}Hook—B	7,4	9,3—8,7
l · II	„ —*l*	13,6	17,0—16,0
v · I	durchschnittl.	9,6	12,0—11,3
Typ A (v)	^{h}Hook—v	4,2	5,2—4,9
	„ —I	5,4	6,8—6,4
mk · ml	„ —ml	8,7	10,9—10,2
k_{oak} · l_{oak}	„ —k_{oak}	25,7	32,1—30,2
ck · cl	„ —ck	53,5	66,9—62,9
hsc · hsc	„ —hsc	79,5	99,4—93,5
I · I	„ —I	28,2	35,2—33,2
ha · ha	„ —ha	0,0	0,0
hl · hl	„ —hl	7,7	9,6—9,1

Bei den Kreuzungen mit l_{str} · v_{str} und l_{Se} · v_{Se} kann nur angegeben werden, daß 28,1—24,6% bzw. 42,7—40,0% befruchtet wurden. Da die Samen alle taub waren, können die Affinitäten dieser Kreuzungen nicht bestimmt werden, wohl aber für die nächstfolgenden, bei denen durch den Pollen jeweils nur ein Komplex übertragen wird. Von diesen seien nur die *Hookeri* × ck · cl-Kreuzungen herausgegriffen. 66,9—62,9% der fertilen *Hookeri*-Samenanlagen wurden befruchtet, also sehr viel. Die reziproken Kreuzungen dagegen setzten nicht an. Bemerkenswert ist noch bezüglich der I · I-Kreuzungen, daß der von Kistner mitgeteilte Wert von 29,7% für die I · ^{h}Hook fast derselbe ist wie in diesen Kreuzungen (28,2%).

In der Tabelle 8 sind die Affinitäten nach fallenden Werten angeordnet. Aus ihr ist zu entnehmen, wie verschieden stark die verschieden

konstituierten Pollenschläuche von den *Hookeri*-Samenanlagen chemotropisch angezogen werden. Sie reagieren also auf die von diesen ausgeschiedenen chemotropisch wirksamen Stoffe sehr unterschiedlich.

In der Tabelle 5 waren die fallenden Werte für die Affinitäten durchnumeriert worden. Es steht beispielsweise die Affinität ha—^{h}Hook an 13. Stelle. Die vergleichbaren Affinitäten aus den reziproken Kreuzungen erhielten in der Tabelle 8 die gleiche Nummer, also die Affinität ^{h}Hook—ha die Nummer 13. Jetzt sieht man, daß die Reihenfolge nicht eingehalten ist. Es müssen also Unterschiede vorhanden sein. Diese zeigt die Tabelle 9.

Tabelle 8. *Die Affinitäten (= % befr. fert. Sa.-Anl.) in den Kreuzungen mit Oe. Hookeri ♀♀, nach fallenden Werten angeordnet.*

	Die Affinität = % befrucht. fert. Sa.-Anl.		
hsc · hsc	^{h}Hook—hsc	99,4—93,5	1
ck · cl	„ —ck	66,9—62,9	22
I · I	„ —I	35,2—33,2	8
$k_{oak} \cdot l_{oak}$	„ —k_{oak}	32,1—30,2	6
l · II	„ —l	17,0—16,0	10
mk · ml	„ —ml	10,9—10,2	21
hl · hl	„ —hl	9,6—9,1	17
B · II	„ —B	9,3—8,7	18
v · I	„ —I	6,8—6,4	12
(errechnet) Typ A (v)	„ —v	5,2—4,9	7
ha · ha	„ —ha	0,0	13

Im allgemeinen ziehen die *Hookeri*-Samenanlagen die verschieden konstituierten Pollenschläuche schlechter an als die entsprechenden Samenanlagen die *Hookeri*-Schläuche. Aus dem Vergleich des Samenansatzes allein hätte sich das nicht ergeben. Die Unterschiede sind verschieden groß, deshalb ist die Reihenfolge bei den Affinitäten ^{h}Hook —. . . eine andere als bei den Affinitäten . . . —^{h}Hook. Gleich sind I—^{h}Hook und ^{h}Hook—I nur wenig größer ^{h}Hook—hsc und ^{h}Hook—ml. Ob die Unterschiede gesichert sind, muß offen bleiben. Ungewöhnlich groß ist der Unterschied zwischen den Affinitäten ck—^{h}Hook = 0 und ^{h}Hook—ck = 66,9—62,9.

Tabelle 9. *Vergleich der aus den reziproken Kreuzungen mit Oe. Hookeri ermittelten Affinitäten.*

Affinität ^{h}Hook zu	1 *Oe. Hook.* ♀ % befr. fert. Sa.-Anl.	2 *Oe. Hook.* ♂ % befr. fert. Sa.-Anl.	1 mit 2 vergl.
hsc	99,4—93,5	94,4—82,6	(+)
ck	66,9—62,9	0,0	+
I von I · I	35,2—33,2	40,5—30,4	=
k_{oak}	32,1—30,2	50,5—33,7	—
l	17,0—16,0	29,6—24,7	—
ml	10,9—10,2	9,0—6,0	(+)
hl	9,6—9,1	21,1—18,5	—
B	9,3—8,7	17,2—14,3	—
I	6,8—6,4	28,8—24,0	—
v	5,2—4,9	49,6—41,3	—
ha	0,0	27,5—14,1	—

Da die Samen aus den Kreuzungen der *Oe. Hookeri* mit $l_{str} \cdot v_{str}$ ♂♂ und $l_{Se} \cdot v_{Se}$ ♂♂ alle taub waren, konnten die diesbezüglichen Affinitäten nicht bestimmt werden. Man kann aber doch annähernd angeben,

ob die Affinitäten bei Kreuzungen mit *Oe. Hookeri* ♀♀ größer oder kleiner werden. Man braucht dafür nur unter Zugrundelegung der durchschnittlichen Samenansätze der Kreuzungen mit $l_{str} \cdot v_{str}$ und $l_{Se} \cdot v_{Se}$ ♀♀ den Samenansatz bei den *Oe. Hookeri* $\times$ $l_{str} \cdot v_{str}$- bzw. $l_{Se} \cdot v_{Se}$-Kreuzungen zu berechnen. Ist dieser größer als der tatsächlich gefundene, so nehmen die Affinitäten ab; ist er aber kleiner, so nehmen sie zu. Ohne die Zahlen anzuführen sei nur angegeben, daß die *Oe. Hookeri* $\times$ $l_{str} \cdot v_{str}$-Kreuzungen in die — -Gruppe, die *Oe. Hookeri* $\times$ $l_{Se} \cdot v_{Se}$-Kreuzungen aber in die + -Gruppe der Tabelle 9 einzureihen sind.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen im wesentlichen die Befunde aus früheren Versuchen. Aber ein so weitgehender Vergleich der Affinitäten bei verschiedenen Kreuzungen mit den gleichen ♂♂ bzw. ♀♀ und ein solcher der Affinitäten bei reziproken Kreuzungen war bislang noch nicht möglich gewesen. Das lohnte die große aufgewandte Mühe.

Zusammenfassung.

10 *Oenotheren*-Arten aus der Sektion *Raimannia* wurden mit der *Oe. Hookeri* reziprok gekreuzt. Die Kreuzungen setzten recht verschieden an. Um sie untereinander vergleichen zu können, wurde berechnet, wieviel von den fertilen Samenanlagen jeweils befruchtet wurden. Dabei ergab sich, daß einerseits die verschieden konstituierten Samenanlagen die gleichen Pollenschläuche verschieden gut chemotropisch anziehen und daß andererseits die verschieden konstituierten Pollenschläuche auf die von den Samenanlagen der *Oe. Hookeri* ausgeschiedenen chemotropisch wirksamen Stoffe verschieden gut reagieren. Durch besondere Versuche konnte gezeigt werden, daß die ^{h}Hook-Schläuche von den Samenanlagen der *Oe. campylocalyx* nicht chemotropisch angezogen werden. Deshalb setzen die *Oe. campylocalyx* $\times$ *Hookeri*-Kreuzungen nicht an. Bei den reziproken Kreuzungen wurden bemerkenswerte Unterschiede festgestellt.

Literatur.

Kistner, G.: Über plastidenbedingtes Absterben während der Embryonalentwicklung einiger Oenotherenbastarde. Z. Vererbungslehre **86**, 521 (1955). — Leuchtmann, G.: Die Eliminierung von Austauschgonen bei *Oenotheren*. II. Z. Vererbungslehre **86**, 480 (1955). — Loertzer, B.: Weitere Untersuchungen zur selektiven Befruchtung. Diss. Erlangen 1954. — Schneider, G.: Wachstum und Chemotropismus von Pollenschläuchen. Z. Bot. (im Druck). — Schwemmle, J.: Der Einfluß des Plasmas auf die Affinität zwischen Samenanlagen und Pollenschläuchen. Biol. Zbl. **71**, 487 (1952). — Schwemmle, J., u. W. Koepchen: Weitere Untersuchungen zur selektiven Befruchtung. Z. Vererbungslehre **85**, 307 (1953).

Prof. Dr. J. Schwemmle, Erlangen, Botan. Institut der Universität.

Aufnahmebedingungen.

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach Jansen" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Namen von Zwillingsautoren werden im Text der Verdeutlichung wegen durch „u." statt durch „und" verbunden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Quantenbiologie

Einführung in einen neuen Wissenszweig. Von **Friedrich Dessauer,** o. ö. Professor em., Dr. phil. nat., Dr. med. h. c., Dr. theol. h. c., Frankfurt a. M. Mit 43 Textabbildungen. IV, 178 Seiten Gr.-8°. 1954. Steif geheftet DM 18.60

Aus den Besprechungen: . . . Das Buch von Dessauer unterscheidet sich von den früheren Darstellungen anderer Autoren über den gleichen Gegenstand in sachlicher Hinsicht durch eine mehr historisch gerichtete Einführung in die Begriffswelt der Treffertheorie und durch eine relativ ausführliche Darstellung der aktuellen Probleme, die sich heute vor allem auf die sog. „indirekte Strahlenwirkung" erstrecken. Die klassischen Anwendungen der Treffertheorie, insbesondere die genetischen Anwendungen, haben eine knappere Darstellung gefunden. Die Diktion des Buches ist getragen durch einen überlegenen, gänzlich undogmatischen Geist. Die Verdienste der an der Entwicklung des Gebietes beteiligten Forscherpersönlichkeiten und Schulen werden in objektiver Weise gewürdigt, und insbesondere gelangen auch die Kritiker der Treffertheorie zu Worte . . .

K. Sommermeyer, Freiburg i. Br., in „Radiologia Clinica"

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Temperatur und Leben

Von Professor Dr. **Herbert Precht,** Zoologisches Institut der Universität Kiel, Dr. **Jes Christophersen,** Bakteriologisches Institut der Bundes-Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Kiel, und Professor Dr. **Herbert Hensel,** Physiologisches Institut der Universität Marburg a. d. Lahn. 3 Teile in einem Band. Mit 182 Abbildungen. XII, 514 Seiten Gr.-8°. 1955. Ganzleinen DM 78.—

Inhaltsübersicht:

Erster Teil: **Wechselwarme Tiere und Pflanzen.** Von Professor Dr. Herbert Precht, Zoologisches Institut der Universität Kiel. Einleitung. — **Der Einfluß der Temperatur auf physikalisch-chemische Prozesse und auf biologisch bedeutsame Stoffe.** — Die Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit (*RG*). — Die Beeinflussung der Stoffe: Wasser. Eigenschaften der Proteine. Hitzeeinwirkung auf Proteine. Kälteeinwirkung auf Proteine. — **Der Einfluß der Temperatur auf Lebensprozesse.** Sich nicht verändernde Reaktionssysteme: Der normale Temperaturbereich. Der Einfluß extremer Temperaturen. Gemeinsame Erklärungsmöglichkeiten von Leistungs- und Resistenzadaptation. — Sich ändernde Reaktionssysteme: Der normale Temperaturbereich. Extreme Temperaturen. Formative Wirkungen durch normale und extreme Temperaturen. — Körpertemperatur und Außentemperatur: Wärmeproduktion und -abgabe. Der Einfluß der Sonnenstrahlen. — Temperatur und Verhalten: Die Temperaturabhängigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit und anderer Tätigkeiten. Der Einfluß auf taktische Orientierungen. Der Einfluß der Temperatur auf Lernen, Gedächtnis usw. Der Temperatursinn. — Die Bedeutung des Temperaturfaktors für die Verbreitung der wechselwarmen Organismen: Temperaturbedingungen verschiedener Lebensräume. Temperaturbedingte Verbreitungsgrenzen. Ursachen der Begrenzung. Eurytherme und stenotherme Arten. Verschiedene Temperaturansprüche von verwandten Arten und Rassen. Erblich bedingte Anpassungserscheinungen. Chromosomenzahl. Der Übergang Süßwasser—Meer.

Zweiter Teil: **Mikroorganismen.** Von Dr. Jes Christophersen, Bakteriologisches Institut der Bundes-Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Kiel. Einleitung. — Der Einfluß der Temperatur auf Wachstum und Vermehrung von Mikroorganismen: Der Einfluß der Temperatur auf das Wachstum von Zellen. Der Einfluß der Temperatur auf die Vermehrung der Mikroorganismen. — Der Einfluß der Temperatur auf physiologische Eigenschaften von Mikroorganismen: Stoffwechsel der Gesamtzellen. Anpassungserscheinungen. — Die Hitzeabtötung von Mikroorganismen: Die Absterbeordnung. Die Hitzeresistenz von Mikroorganismen. Die Hitzeresistenz von Enzymen. Beziehungen zwischen Proteinbzw. Enzyminaktivierungen und Hitzeabtötung von Mikroorganismen. — Thermophile Organismen: Allgemeines. Die Biologie der thermophilen Mikroorganismen. Die Thermophilie als biologisches Problem. — Die Wirkung tiefer Temperaturen auf Mikroorganismen: Kälteresistenz. Die Vermehrung bei tiefen Temperaturen. Der Stoffwechsel bei tiefen Temperaturen. Der Mechanismus der Kälteabtötung. Die Absterbeordnung. Die Anwendung tiefer Temperaturen zur Haltbarmachung von Lebensmitteln. — Der Temperatureinfluß auf Bakteriensporen: Die Eigenschaften der Sporen. Die Hitzeresistenz von Sporen. Die Temperaturabhängigkeit von Sporenkeimung und -bildung. Die Hitzeinaktivierung von Sporen. — Die Temperaturabhängigkeit von Giftwirkungen: Temperaturkoeffizient. Bakteriostatische Wirkungen. Therapeutische Anwendung.

Dritter Teil: **Mensch und warmblütige Tiere.** Von Professor Dr. Herbert Hensel, Physiologisches Institut der Universität Marburg a. d. Lahn. Homoiothermie und Poikilothermie. — Die Körpertemperaturen. — Homoiothermie als biologischer Regelungsvorgang. — Die Bildung der Körperwärme. — Der Abfluß der Körperwärme. — Nervöse und hormonale Steuerungen. — Thermoreceptoren. — Verstellungen der Temperaturregelung. — Akklimatisation. — Temperaturgrenzen des Lebens. — Temperatur und Entwicklung. — Winterschlaf und verwandte Erscheinungen. — Temperatur und geographische Verbreitung der Homoiothermen.

Nachträge. — Namen- und Sachverzeichnis. — Zitierte Organismen.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, und ein Prospekt des Springer-Verlages, Wien, bei.

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg.
Printed in Germany.